

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75308 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 15/62 (30) Angaben zur Priorität:
199 26 068.0 8. Juni 1999 (08.06.1999) DE

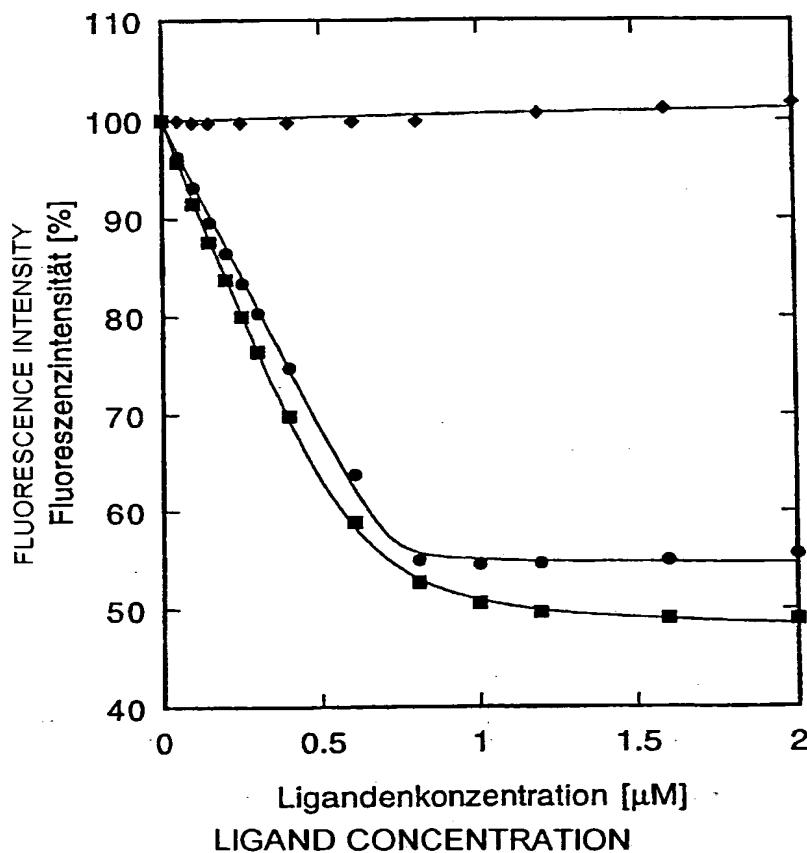
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01873 (71) Anmelder und
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juni 2000 (08.06.2000) (72) Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SKERRA, Arne [DE/DE]; Max-Lehner-Str. 18, D-85354 Freising (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch (72) Erfinder; und
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHLEHUBER, Stefan [DE/DE]; Murstr. 21, D-85356 Freising (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MUTEINS OF BILIN-BINDING PROTEIN

(54) Bezeichnung: MUTEINE DES BILIN-BINDUNGSPROTEINS



(57) Abstract: The invention relates to muteins of bilin-binding protein with a binding ability to digoxigenin and the fusion proteins of said muteins, a method for preparing said muteins and fusion proteins thereof and to their utilization for detecting or binding digoxigenin-labeled biomolecules. The invention especially relates to a polypeptide selected from the muteins of the bilin-binding protein, which is characterized in that (a) it can bind digoxigenin or digoxigenin conjugates; (b) it does not bind ouabain, testosterone and 4-aminofluorescein (c) at least one of the sequence positions 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 and 127 of the bilin-binding protein has an aminoacid substitution. Due to their simple molecular structure, the inventive muteins provide advantages for production and utilization in comparison with antibodies against the digoxigenin group.

WO 00/75308 A1

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

BEST AVAILABLE COPY



(74) Anwalt: VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;
Steinsdorfstr. 6, D-80538 München (DE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung bezieht sich auf Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag, (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen (28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127) des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist. Aufgrund ihres einfachen molekularen Aufbaus weisen der erfindungsgemässen Muteine bei Herstellung und Verwendung Vorteile im Vergleich zu Antikörpern gegen die Digoxigeningruppe auf.

Muteine des Bilin-Bindungsproteins

Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung heterogärtiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen.

10 Die Digoxigeningruppe ist ein heute in der Molekularbiologie weit verbreitetes Instrument für den nichtradioaktiven Nachweis von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Biomolekülen. Zu diesem Zweck wird das Biomolekül mit einem reaktiven Derivat des Digoxigenins meist kovalent modifiziert, was den anschließenden Nachweis des Moleküls mit einem gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörper, bzw. einem Konjugat aus einem entsprechenden Antikörperfragment und einem Reporterenzym, gemäß in der Biochemie allgemein üblichen Methoden gestattet.

20 Dem Fachmann sind eine ganze Reihe von reaktiven Digoxigeninderivaten bekannt, die teilweise auch kommerziell erhältlich sind. Beispielsweise eignen sich Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester (DIG-NHS), Digoxigenin-3-O-succinyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester und 3-Amino-3-desoxydigoxigenin-hemisuccinamid-succinimidylester zur kovalenten Kopplung mit Proteinen, insbesondere mit den Aminogruppen von exponierten Lysinseitenketten. Mit 3-Iodacetylamino-3-desoxydigoxigenin lassen sich vor allem Thiolgruppen in Proteinen oder anderen Biomolekülen selektiv mit der Digoxigeningruppe markieren. Synthetische Oligodesoxy-nukleotide können mit denselben reaktiven Digoxigeninderivaten gekoppelt werden, sofern sie im Verlauf der Synthese mit geeigneten freien Amino- oder 30 Thiolgruppen versehen wurden.

Zur direkten Markierung von Nukleinsäuren eignen sich zudem cis-Platinkomplexe von Digoxigeninderivaten (DIG Chem-Link

Reagent) oder Carbodiimidgruppen enthaltende Digoxigeninderivate (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 806 431 A2). Alternativ ist es im Fall von Desoxyribonukleinsäuren möglich, diese im Verlauf einer matrizenabhängigen enzymatischen Synthese unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase und eines mit der Digoxigeningruppe gekoppelten Desoxynukleosidtriphosphats, z.B. Digoxigenin-11-dUTP, Digoxigenin-11-ddUTP oder Digoxigenin-16-dATP, zu markieren. Analog eignet sich Digoxigenin-11-UTP zum Einbau in enzymatisch synthetisierte RNA. Darüber hinaus können Oligodesoxynukleotide direkt bei der automatisierten DNA-Synthese unter Einsatz geeigneter aktivierter Bausteine, z.B. sogenannter "Virtual Nucleotides", mit der Digoxigeningruppe markiert werden. Derartige mit der Digoxigeningruppe gekoppelte Nukleinsäuren eignen sich als nichtradioaktive Gensonden zum Nachweis komplementärer Nukleotidsequenzen durch Hybridisierung, z.B. in Northern oder Southern Blots (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 324 474 A1).

Mit der Digoxigeningruppe markierte Proteine oder Glycoproteine sind insbesondere von Nutzen, um beispielsweise entsprechende Antigene bzw. dagegen gerichtete Antikörper in immunchemischen Testverfahren wie ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) zu bestimmen. Der eigentliche Nachweis des mit der Digoxigeningruppe konjugierten Biomoleküls erfolgt normalerweise mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, in der Regel in der Form eines Konjugats aus dem Fab-Fragment dieses Antikörpers mit einem geeigneten Enzym, wie z.B. der Alkalischen Phosphatase oder der Meerrettich-Peroxidase, als Markierung. Die enzymatische Aktivität dient anschließend zur Quantifizierung durch Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder chemolumineszenten Reaktion. Verschiedene Antikörper gegen die Digoxigeningruppe sind bekannt (Mudgett-Hunter et al., J. Immunol. 129 (1982), 1165-1172; Jeffrey et al., J. Mol. Biol. 248 (1995), 344-360).

Die Verwendung von Antikörpern hat jedoch mehrere Nachteile. So ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Hybridom-

zellkulturen aufwendig, und die Proteolyse zum Fab-Fragment sowie die Produktion von Konjugaten mit Reporterenzymen erfordert zusätzliche schwierige Verfahrensschritte. Aber selbst die gentechnische Gewinnung von Antikörpern ist nicht 5 einfach, was hauptsächlich darin begründet ist, daß sich Antikörper wie auch deren antigenbindende Fragmente in strukturell komplizierter Weise aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzen. Bei der gentechnischen Manipulation von Antikörpern müssen deshalb zwei Gene 10 gleichzeitig gehandhabt werden. Außerdem ist die Ausbeute an korrekt gefalteten Antikörperfragmenten bei deren gentechnischer Produktion häufig gering. Wie dem Fachmann bekannt ist, gilt dies umso mehr, wenn rekombinante Fusionsproteine aus Fab-Fragmenten von Antikörpern und Enzymen 15 hergestellt werden sollen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, alternative Polypeptid-Reagenzien zum Nachweis der Digoxigeningruppe zu entwickeln, welche sich auf einfache Weise produzieren lassen.

20 In einem evolutiven Forschungsansatz wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß sich Muteine des strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten Bilin-Bindungsproteins (Schmidt und Skerra, Eur. J. Biochem. 219 (1994), 855-863) eignen, um die Digoxigeningruppe durch Bindung mit hoher Affinität nachzuweisen, wobei die Erkennung 25 des Digoxigenins erstaunlich selektiv gegenüber anderen Steroiden erfolgt.

30 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es
(a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
35 (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
(c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des

Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

Bevorzugt sind dabei Digoxigenin bindende Muteine, die an zumindest 4 bis 7 oder vorzugsweise zumindest 8 bis 12 der vorstehend definierten Sequenzpositionen eine Aminosäuresubstitution aufweisen. Ein besonders bevorzugtes Mutein ist das Polypeptid, das die in SEQ ID NO. 15 dargestellte Aminosäuresequenz besitzt.

10 Außerhalb des Bereichs der Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 können die Muteine der vorliegenden Erfindung der Aminosäuresequenz des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae* entsprechen. Andererseits kann die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Polypeptide auch außerhalb der genannten Positionen Unterschiede zum Bilin-Bindungsprotein aufweisen. Derartige Varianten der Sequenz des Bilin-Bindungsproteins umfassen natürlich vorkommende sowie künstlich erzeugte Varianten, und unter den Abweichungen werden Substitutionen, Insertionen, Deletionen von Aminosäureresten sowie N- und/oder C-terminale Additionen verstanden.

20 Z. B. können die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins Aminosäuresubstitutionen aufweisen, welche eine Oligomerisierung des Bilin-Bindungsproteins vermeiden, wie die Substitution Asn(1)->Asp, oder um eine proteolytische Spaltung innerhalb der Polypeptidkette zu unterdrücken, die bei der Produktion in *E. coli* auftreten kann, z.B. durch die Substitution Lys(87)->Ser. Weiterhin können in die für die 30 Muteine des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure die Mutationen Asn(21)->Gln und Lys(135)->Met eingeführt werden, um beispielsweise die Klonierung eines Genabschnitts über zwei neue *Bst*XI-Restriktions-schnittstellen an diesen Positionen zu erleichtern. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die 35 gezielte Einführung von Aminosäuresubstitutionen innerhalb oder außerhalb der genannten Positionen, um ganz allgemein bestimmte Eigenschaften des erfindungsgemäßen Muteins zu verbessern, z.B. seine Faltungsstabilität oder -effizienz oder seine

Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen:

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide, Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden, kann durch übliche 5 Verfahren, z.B. ELISA, Fluoreszenztitration, Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen oder Blotting-Verfahren, beispielsweise Western-Blotting, Southern-Blotting oder Northern-Blotting, bestimmt werden. Blotting-Methoden können verwendet werden, um Konjugate des Digoxigenins 10 mit Proteinen oder Nukleinsäuren auf eine Membran zu transferieren und diese anschließend mit einem der erfindungsgemäßen Muteine, einem Konjugat dieses Muteins oder einem Fusionsprotein dieses Muteins nachzuweisen.

15 Eine quantitative Kenngröße für die Bindungsaffinität liefern etablierte thermodynamische Parameter, wie etwa die Affinitätskonstante oder die Dissoziationskonstante für den Komplex aus dem Mutein und dem gebundenen Liganden, z.B. Digoxigenin. Aber auch eine qualitative Bestimmung der Bindungsfähigkeit ist möglich, z.B. anhand der Intensität eines Bindungssignals aufgrund einer chromogenen Reaktion bzw. eines Farbniederschlags, welcher mit Hilfe einer der genannten 20 Blotting-Methoden erhalten wird.

25 Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine sind in einem zweistufigen evolutiven Prozeß erhältlich. Die Zufallsmutagenese des Bilin-Bindungsproteins an mindestens einer, bevorzugt an zumindest 4 bis 7, und besonders bevorzugt an zumindest 8 bis 12 der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 30 95, 97, 114, 116, 125 und 127 und die nachfolgende einfache oder vorzugsweise wiederholte Selektion von Muteinen mit Affinität zur Digoxigeningruppe aus dieser Bibliothek, wobei vorzugsweise freies Digoxigenin oder Digitoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird, liefert Muteine des 35 Bilin-Bindungsproteins, die die Digoxigeningruppe erkennen, wobei aber die Affinität noch vergleichsweise niedrig ist. Die erneute Mutagenese eines solchen Muteins an zumindest einer, vorzugsweise zumindest 3 oder 4, oder an allen der

Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37, nun gefolgt von einer einfachen oder vorzugsweise wiederholten Anreicherung durch Komplexbildung mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des gebildeten Komplexes im sauren 5 oder basischen Milieu, führt daraufhin zur Gewinnung von Muteinen mit wesentlich höherer Affinität zur Digoxigeningruppe. Bei dieser Anreicherung liegt die Digoxigeningruppe vorzugsweise als Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat vor.

10

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Affinitätskonstante zwischen solchen erfindungsgemäßen Polypeptiden und Digoxigenin mindestens 10^7 M⁻¹ beträgt. Anders ausgedrückt heißt dies, daß die Dissoziationskonstante des 15 Komplexes aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist. Einzelne Exemplare zeigen sogar Dissoziationskonstanten von 35 nM oder kleiner, wie in den Beispielen ausgeführt ist.

20 Neben dem Digoxigenin können von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins auch Derivate des Digoxigenins als Ligand gebunden werden, z.B. Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin. Weiterhin können Konjugate dieser chemischen Verbindungen, d. h. mit Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder 25 Digitoxigenin kovalent oder über einen Metallkomplex verknüpfte Nukleinsäuren, Polypeptide, Kohlenhydrate, andere natürliche oder synthetische Biomoleküle, Makromoleküle oder niedermolekulare Verbindungen, von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins gebunden werden.

30 Vorzugsweise werden zur Herstellung solcher Konjugate die dem Fachmann bekannten reaktiven Derivate von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin eingesetzt, wie sie beispielsweise weiter oben angegeben sind.

35 Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine, welche durch den beschriebenen zweistufigen Prozeß gewonnen wurden, zeigen im Vergleich zu Digoxigenin eine noch höhere Affinität zu Digitoxin oder Digitoxigenin, deren Steroidsystem sich bloß

durch das Fehlen einer Hydroxygruppe von dem des Digoxigenins unterscheidet. Überraschenderweise zeigen diese Muteine eine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf die Digoxigenin- bzw. 5 Digitoxigeningruppe, was sich darin ausdrückt, daß andere Steroide oder Steroidgruppen wie Ouabain oder Testosteron mit sehr viel geringerer Affinität, falls überhaupt, gebunden werden. Auch Derivate des Fluoresceins, wie 4-Aminofluorescein, werden offensichtlich nicht gebunden. Damit ist gemeint, daß Ouabain, Testosteron oder 4-Aminofluorescein jeweils eine 10 Dissoziationskonstante von mindestens 10 μ M, bevorzugt mindestens 100 μ M, gegenüber den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins aufweisen.

In dieser Spezifitätseigenschaft unterscheiden sich diese 15 Muteine erheblich von anderen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins sowie von gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörpern, wie z.B. dem Antikörper 26-10 (Chen et al., Protein Eng. 12 (1999), 349-356), welcher Ouabain mit beträchtlicher Affinität bindet, was den erfindungsgemäßen 20 Muteinen des Bilin-Bindungsproteins einen besonderen Vorteil verleiht. Es ist überraschend, daß gerade die zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 zu den bevorzugten Muteinen des Bilin-Bindungsproteins führen. Bevorzugt sind daher solche Muteine, die mindestens 25 eine, vorzugsweise mindestens 3 oder 4 oder alle der Aminosäuresubstitutionen Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile und Glu(37)->Thr tragen.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Muteine tragen mindestens 30 eine, mindestens 4 bis 7, oder vorzugsweise mindestens 8 bis 12 der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, 35 Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein. Bei der gewählten Schreibweise ist jeweils zunächst die Aminosäure in dem natürlichen Bilin-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-

Zugriffscode P09464) zusammen mit der Sequenzposition für das mature Polypeptid in Klammern angegeben, und die entsprechende Aminosäure in einem erfindungsgemäßen Mutein ist nach dem Pfeil genannt. Nochmals besonders bevorzugte Muteine gemäß dieser 5 Erfindung tragen alle der genannten Aminosäuresubstitutionen.

Es ist überraschend, daß die Position 93 des Bilin-Bindungsproteins in den erfindungsgemäßen Muteinen nicht verändert ist, obwohl auch diese Aminosäure von der Mutagenese 10 zur Herstellung der Zufallsbibliothek betroffen war. Bevorzugte Muteine des Bilin-Bindungsproteins tragen daher an dieser Position die Aminosäure Val.

Für bestimmte Nachweisverfahren ist es günstig, die Muteine des 15 Bilin-Bindungsproteins der vorliegenden Erfindung in markierter Form zu verwenden. Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es zumindest eine Markierung trägt. Geeignete Markierungsgruppen sind dem Fachmann bekannt und 20 umfassen Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumineszenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold. Ganz allgemein ist die Markierung mit Substanzen bzw. Enzymen möglich, die in einer chemischen oder 25 enzymatischen Reaktion einen bestimmbarer Stoff erzeugen. Dabei können alle für Antikörper bekannten Markierungen auch an die erfindungsgemäßen Muteine gekoppelt werden.

Eine für die praktische Anwendung besonders vorteilhafte 30 Möglichkeit besteht darin, die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins in der Form von Fusionsproteinen zu verwenden. Techniken zur Herstellung solcher Fusionsproteine mittels gentechnischer Methoden sind dem Fachmann bekannt. Geeignete Fusionspartner für die erfindungsgemäßen Muteine 35 wären Enzyme und andere Polypeptide, Proteine oder Proteindomänen. Derartige Fusionen wären geeignet, um dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins zusätzliche Eigenschaften zu vermitteln, wie z.B. enzymatische Aktivität oder Affinität zu

anderen Molekülen, wie Proteinen, Makromolekülen oder niedermolekularen Liganden.

Beispielsweise sind Fusionen mit Enzymen, welche chromogene oder fluorogene Reaktionen katalysieren oder zur Freisetzung von cytotoxischen Agenzien dienen können, möglich. Weitere Beispiele für Fusionspartner, die in der Praxis von Vorteil sein können, sind Bindungsdomänen wie die Albumin-5 Bindungsdomäne oder die Immunglobulin-Bindungsdomäne von Protein G oder Protein A, Antikörperfragmente, Oligomerisierungsdomänen, Toxine oder andere Bindungsproteine und deren funktionelle Bestandteile sowie Affinitätspeptide, wie z.B. das Strep-Tag oder das Strep-Tag II (Schmidt et al., J. Mol. Biol. 255 (1996), 753-766). Auch Proteine mit 10 besonderen chromogenen oder fluorogenen Eigenschaften, wie z.B. das grün fluoreszierende Protein, eignen sich als Fusionspartner. Weiterhin käme das Hüllprotein III eines filamentösen Bakteriophagen, wie M13, f1 oder fd, oder ein 15 Fragment dieses Hüllproteins als Fusionspartner in Frage.

Unter dem Begriff Fusionsproteine sollen hier ganz allgemein auch solche erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-20 Bindungsproteins verstanden werden, die mit einer Signalsequenz ausgestattet sind. Signalsequenzen am N-Terminus des erfindungsgemäßen Polypeptids können dazu dienen, dieses bei 25 der Biosynthese in ein bestimmtes Zellkompartiment, z.B. das Periplasma von *E. coli* oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle, bzw. in das die Zelle umgebende Medium zu dirigieren. Dabei wird die Signalsequenz 30 normalerweise von einer Signalpeptidase abgespalten. Außerdem können andere Signal- bzw. Targeting-Sequenzen verwendet werden, die nicht unbedingt am N-Terminus des Polypeptids angebracht sein müssen, und die dessen Lokalisierung in speziellen Zellkompartimenten ermöglichen. Eine bevorzugte 35 Signalsequenz zur Sekretion in das Periplasma von *E. coli* ist die OmpA-Signalsequenz. Weitere Signalsequenzen sowie Targeting-Sequenzen sind im Stand der Technik in großer Zahl bekannt.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins besteht darin, daß sich sowohl deren N-Terminus als auch deren C-Terminus zur Herstellung von Fusionsproteinen eignet. Im Gegensatz zu Antikörpern, bei denen sich der N-Terminus sowohl der leichten als auch der schweren Immunglobulinkette in räumlicher Nähe zur Antigenbindungsstelle befinden, können bei den erfindungsgemäßen Polypeptiden beide Enden der Polypeptidkette zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, ohne daß die Bindung des Liganden beeinträchtigt wird.

Ein Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist. Ein nochmals weiterer Gegenstand der Erfindung sind Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins oder von Fusionsproteinen mit dem Aminoterminus von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

Ein bevorzugtes Enzym zur Konstruktion der erfindungsgemäßen Fusionsproteine ist die bakterielle Alkalische Phosphatase (Sowadski et al., J. Mol. Biol. 186 (1985) 417-433). Diese kann einerseits am N-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins oder am C-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins angebracht sein. Zusätzlich kann ein solches Fusionsprotein eine Signalsequenz tragen, wie z.B. OmpA oder PhoA, die dessen Sekretion in das Periplasma von *E. coli* bewirkt, wo sich die Disulfidbindungen in der Polypeptidkette effizient ausbilden können. Weiterhin kann es mit einem Affinitätspeptid ausgestattet sein, wie z.B. dem Strep-Tag II, welches dessen einfache Reinigung erlaubt. Spezifische erfindungsgemäße Fusionsproteine sind in den Beispielen beschrieben. Ein Vorteil eines derartigen Fusionsproteins

besteht darin, daß es direkt eine chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Nachweisreaktion katalysieren kann, was seinen Einsatz zur Detektion der Digoxigeningruppe vereinfacht.

5 Ein weiterer Vorteil der Verwendung der Alkalischen Phosphatase zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine besteht darin, daß dieses Enzym zu einem stabilen Homodimer assoziiert und demzufolge dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins als Bestandteil des Fusionsproteins die Eigenschaft der Bivalenz
10 verleiht. Auf diese Weise kann bei der Bindung der Digoxigeningruppe ein Aviditätseffekt resultieren, der die Nachweisempfindlichkeit steigert. Ein solcher Aviditätseffekt ist insbesondere zu erwarten, wenn das mit Digoxigenin
15 markierte Molekül an einer festen Phase adsorbiert ist, in oligomerer bzw. membrangebundener Form vorliegt oder mit mehreren Digoxigeningruppen konjugiert ist. Andere homodimere Enzyme eignen sich analog zur Herstellung bivalenter Fusionsproteine mit den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins.

20

25

30

35

Abgesehen von der bakteriellen Alkalischen Phosphatase können auch Phosphatasen aus eukaryontischen Organismen, wie z.B. die kalbsintestinale Phosphatase (CIP), zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwendet werden. Diese zeichnen sich oftmals durch höhere enzymatische Aktivität aus (Murphy und Kantrowitz, Mol. Microbiol. 12 (1994), 351-357), was eine größere Nachweisempfindlichkeit bewirken kann. Auch Mutanten der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit verbesserter katalytischer Aktivität (Mandecki et al., Protein Eng. 4 (1991), 801-804) lassen sich zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwenden. Weiterhin eignen sich andere dem Fachmann bekannte Enzyme, welche chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Reaktionen katalysieren, wie z.B. die β -Galactosidase oder die Meerrettich-Peroxidase, zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine. All diese Enzyme können darüber hinaus ebenso zur Markierung von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins eingesetzt werden, indem sie z.B. unter Verwendung üblicher Kopplungsreagenzien mit dem separat

gewonnenen Mutein oder einem Fusionsprotein des Muteins konjugiert werden.

Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung 5 eine Nukleinsäure, die eine für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Sequenz umfaßt. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil einer Sequenz umfaßt. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil eines Vektors sein, auf dem eine operativ funktionelle Umgebung 10 zur Expression der Nukleinsäure gegeben ist. Geeignete Vektoren sind in großer Zahl aus dem Stand der Technik bekannt und werden hierin nicht ausführlich beschrieben. Unter einer operativ funktionellen Umgebung werden solche Elemente verstanden, die die Transkription und/oder nachfolgende 15 Prozessierung einer mRNA ermöglichen, begünstigen, erleichtern und/oder erhöhen. Beispiele für derartige Elemente sind etwa Promotoren, Enhancer, Transkriptionsinitiationsstellen und - terminationsstellen, Translationsinitiationsstellen, Polyadenylierungssignale etc. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen solche erfindungsgemäß Nukleinsäuren 20 eine Nukleinsäuresequenz, die die in SEQ ID NO. 15 dargestellte Polypeptidsequenz codiert. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes ist es für den Fachmann klar, daß dabei die 25 in SEQ ID NO. 15 angegebene Nukleotidsequenz nur eine einzige aus der Gruppe der das Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 15 codierenden Nukleotidsequenzen darstellt.

Die erfindungsgemäß Nukleinsäure oder ihre Umgebung kann dabei 30 dargestalt sein, daß die Biosynthese des Polypeptids im Cytosol erfolgt, wobei der Polypeptidsequenz ggf. ein Start-Methionin vorangestellt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird dagegen eine N-terminale Signalsequenz verwendet, insbesondere die OmpA- oder die PhoA-Signalsequenz, um das erfindungsgemäß 35 Polypeptid in das Periplasma von *E. coli* zu dirigieren, wo die Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten wird und sich die Polypeptidkette unter oxidativer Ausbildung der Disulfidbindungen falten kann. Eukaryontische Signalsequenzen können Verwendung finden, um das erfindungsgemäß Polypeptid in einem eukaryontischen Wirtsorganismus zu sekretieren.

Grundsätzlich kommen zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure sowohl prokaryontische, bevorzugt *E. coli*, als auch eukaryontische Zellen wie z.B. Hefen in Betracht.

5 Unter einem nochmals weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Muteins oder Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird. In der Regel wird dazu zunächst eine geeignete Wirtszelle mit einem Vektor, der eine für ein erfindungsgemäbes 15 Polypeptid kodierende Nukleinsäure umfaßt, transformiert. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Biosynthese des Polypeptids erfolgt, und das erfindungsgemäße Polypeptid wird gewonnen.

20 Bezuglich des Herstellungsverfahrens ist zu beachten, daß die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins zwei strukturelle Disulfidbindungen aufweisen, und daß in entsprechenden Fusionsproteinen ggf. zusätzliche Disulfidbindungen vorliegen. Die mit der Proteininfaltung 25 einhergehende Ausbildung dieser Disulfidbindungen ist in der Regel gewährleistet, wenn das erfindungsgemäße Polypeptid mit Hilfe einer geeigneten Signalsequenz in ein Zellkompartiment mit oxidierendem Thiol/Disulfid-Redoxmilieu dirigiert wird, beispielsweise das bakterielle Periplasma oder das Lumen des 30 Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle. Das erfindungsgemäße Polypeptid läßt sich dabei durch Zellfraktionierung freisetzen oder aus dem Kulturüberstand gewinnen. Ggf. läßt sich die Faltungseffizienz durch Überproduktion von Protein-Disulfidisomerasen, wie z.B. dem 35 DsbC-Protein von *E. coli*, oder von Faltungs-Hilfsproteinen steigern.

Andererseits ist es möglich, ein erfindungsgemäbes Polypeptid

im Cytosol einer Wirtszelle, bevorzugt *E. coli*, zu produzieren. Es kann dann z.B. in Form von Einschlußkörpern gewonnen und anschließend *in vitro* renaturiert werden. Je nach Verwendungszweck kann das Protein mittels verschiedener dem 5 Fachmann bekannter Methoden gereinigt werden. Zur Reinigung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins eignet sich z.B. die Affinitätschromatographie mit einem Säulenmaterial, welches Digoxigeningruppen trägt. Zur Reinigung von Fusionsproteinen der Muteine des Bilin-Bindungsproteins 10 können die aus dem Stand der Technik bekannten Affinitätseigenschaften des Fusionsproteins ausgenutzt werden, z.B. die des Strep-Tags oder des Strep-Tags II (Schmidt und Skerra, J. Chromatogr. A 676 (1994), 337-345; Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), die der Albumin- 15 Bindungsdomäne (Nygren et al., J. Mol. Recogn. 1 (1988), 69-74) oder die der Alkalischen Phosphatase (McCafferty et al., Protein Eng. 4 (1991) 955-961). Bei den Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Tatsache, daß die Muteine des Bilin-Bindungsproteins nur aus einer 20 einzelnen Polypeptidkette bestehen, von Vorteil, da weder dafür zu sorgen ist, daß mehrere verschiedene Polypeptidketten gleichzeitig innerhalb einer Zelle synthetisiert werden müssen, noch, daß unterschiedliche Polypeptidketten in funktioneller Weise miteinander assoziieren.

25 Die praktischen Anwendungsmöglichkeiten für die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins entsprechen im wesentlichen denjenigen herkömmlicher Antikörper oder Antikörperfragmente mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin. 30 Demnach betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins in einem Verfahren zum Nachweis, zur Bestimmung, zur Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins 35 mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins oder ihrer Fusionsproteine in Nachweisverfahren kann im wesentlichen analog zu den entsprechenden Nachweisverfahren erfolgen, die für Antikörper gegen Digoxigenin, sowie deren Fragmente und/oder Konjugate, bekannt sind. Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung deshalb ein Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

15 Zu diesem Zweck kann das Mutein direkt, z.B. durch kovalente Kopplung, markiert sein. Aber auch indirekte Markierungen, z.B. mittels markierter Antikörper gegen das Bilin-Bindungsprotein oder dessen Muteine oder gegen Domänen von Fusionsproteinen 20 dieser Muteine, können eingesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung erfindungsgemäßer Fusionsproteine mit einem Enzym, z.B. der Alkalischen Phosphatase, anstelle eines markierten Muteins des Bilin-Bindungsproteins. In diesem Fall lässt sich das Bestimmungsverfahren mit einer besonders geringen Zahl von Verfahrensschritten gestalten, wobei z.B. die 25 Fähigkeit zur Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder lumineszenten Nachweisreaktion durch das Enzym als Bestandteil des Fusionsproteins unmittelbar ausgenutzt werden kann. Die leichte Verfügbarkeit solcher Fusionsproteine stellt hierbei 30 einen besonderen Vorteil im Vergleich zu entsprechenden Fusionsproteinen herkömmlicher Antikörper dar. Die Ausnutzung des oben beschriebenen Aviditätseffekts im Fall eines oligomeren Fusionsproteins stellt einen weiteren Vorteil bei einem solchen Verfahren dar.

35

Ein Bestimmungsverfahren für die Digoxigeningruppe kann z.B. qualitativ zum Nachweis von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Nukleinsäuren in Southern- bzw. Northern-Blots

oder von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Proteinen in Western-Blots durchgeführt werden. Ein Bestimmungsverfahren kann auch quantitativ zum Nachweis von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Proteinen im ELISA durchgeführt werden. Zudem eignet sich ein erfindungsgemäßes Bestimmungsverfahren zum indirekten Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Proteinen oder anderen Molekülen unter Verwendung eines gegen das Protein oder Molekül gerichteten Bindungsproteins, z.B. eines Antikörpers bzw. seines Fragments, 10 welches mit der Digoxigeningruppe konjugiert ist. Auch der indirekte Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Nukleinsäuren unter Verwendung eines mit dieser Nukleinsäure hybridisierenden Gensonde, welche mit der Digoxigeningruppe konjugiert ist, ist möglich. Eine Anwendung in der 15 medizinischen Diagnostik oder Therapie ergibt sich zudem bei der Bestimmung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin, ohne daß diese Liganden mit einem anderen Molekül konjugiert sein müssen.

20 Die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine können auch zur Immobilisierung eines mit der Digoxigeningruppe konjugierten Moleküls verwendet werden. Diese Immobilisierung erfolgt vorzugsweise an mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen beschichteten Festphasen, wie etwa 25 Mikrotiterplatten, Immunosticks, Mikrobeads aus organischen, anorganischen oder paramagnetischen Materialien oder Sensoroberflächen.

30 Dementsprechend können die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine ebenfalls zur Abtrennung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin oder eines mit einer dieser Verbindungen konjugierten Moleküls verwendet werden. In diesem Fall kommen neben den genannten Festphasen auch 35 Säulenmaterialen zur Beschichtung mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen in Betracht. Vorzugsweise kann diese Beschichtung durch Kopplung mittels chemisch reaktiver Gruppen auf geeigneten Säulenmaterialien erfolgen. Derartig beschichtete Säulenmaterialen können zur Abtrennung von mit

Digoxigeningruppen konjugierten Substanzen sowie ggf. von Komplexen aus solchen Substanzen mit anderen Molekülen aus einer Lösung verwendet werden.

5 Beispielsweise können so Antigene aus einer Lösung abgetrennt werden, indem die Lösung mit Antikörpern versetzt wird, welche gegen die Antigene gerichtet und mit der Digoxigeningruppe konjugiert sind, und die erhaltene Lösung mit dem genannten Säulenmaterial unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird,
10 unter denen eine Komplexbildung zwischen den Digoxigeningruppen und einem erfindungsgemäßen Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder seinem Fusionsprotein erfolgt. Ggf. ist im Anschluß an eine solche Abtrennung auch eine Elution der mit Digoxigenin konjugierten Substanz möglich. Diese Elution kann durch
15 Kompetition mit Digoxin, Digoxigenin, Digitoxin oder Digitoxigenin erfolgen sowie z.B. durch Absenkung oder Erhöhung des pH-Werts der Lösung. Bei einer kompetitiven Elution kann dabei die höhere Bindungsaaffinität der erfindungsgemäßen Muteine zu Digitoxigenin oder Digitoxin im Vergleich zur
20 Digoxigeningruppe in vorteilhafter Weise ausgenutzt werden. Auf diese Weise läßt sich eine mit Digoxigenin konjugierte Substanz isolieren oder reinigen.

25 Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch die nachstehenden Beispiele und die beigefügten Zeichnungen, in denen:

Figur 1 jeweils eine Fluoreszenztitration des mit dem Strep-tag II fusionierten Muteins DigA16 mit den Liganden
30 Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain wiedergibt;

Figur 2 die Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B) zur Herstellung von Fusionsproteinen des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase schematisch darstellt;

35 Figur 3 den quantitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase in einem

ELISA demonstriert;

Figur 4 den qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des S Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase auf einem Western-Blot zeigt.

Figur 1 zeigt die graphische Darstellung von Ergebnissen aus Beispiel 3, bei der eine $1 \mu\text{M}$ Lösung des Muteins DigA16 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Steroide Digoxigenin (Quadrate), Digitoxigenin (Kreise) und Ouabain (Rauten) 10 versetzt wurde. Die jeweiligen Proteinfluoreszenzintensitäten wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm gemessen und gegen die aktuelle 15 Gesamtkonzentration des Steroids im jeweiligen Ansatz aufgetragen. Die Datenpunkte wurden schließlich mittels nicht linearer Regression durch eine Ausgleichskurve angepaßt.

Figur 2 zeigt eine Zeichnung der Expressionsvektoren pBBP27 (A) 20 und pBBP29 (B). pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit ihrer eigenen Signalsequenz, einem Peptid-Linker mit der Sequenz Pro-Pro-Ser-Ala, dem Mutein DigA16 sowie dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel. Das entsprechende Strukturgen wird von dem *dsbC*- 25 Strukturgen (einschließlich dessen ribosomaler Bindungsstelle) aus *E. coli* (Zapun et al., *Biochemistry* 34 (1995), 5075-5089) als zweitem Cistron gefolgt. Das dadurch gebildete künstliche Operon steht unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($\text{tet}^{P/O}$) und endet am 30 Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{1pp}). Weitere Elemente des Vektors sind der Replikationsursprung (*ori*), die intergenische Region des filamentösen Bakteriophagen *f1* (*f1-IG*), das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und das Tetracyclin-Repressorgen (*tetR*). pBBP29 kodiert 35 für ein Fusionsprotein aus der *OmpA*-Signalsequenz, dem Mutein DigA16, dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel, einem Peptid-Verbindungsstück bestehend aus fünf Glycinresten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase ohne ihre N-terminale

Aminosäure Arginin. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereiches sind mit dem Vektor pBBP27 identisch.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 4, in dem der quantitative Nachweis von Digoxigeningruppen mit Hilfe der Fusionsproteine des Muteins DigA16 als Genprodukt der Vektoren pBBP27 (geschlossene Symbole) und pBBP29 (offene Symbole) geführt wurde. Hierbei waren die Digoxigeningruppen einerseits an Rinder-Serumalbumin (BSA, Quadrate) oder andererseits an Albumin aus Hühner-Ei (Ovalbumin, Dreiecke) gekoppelt. Als Kontrolle sind die Daten dargestellt, die bei der Verwendung von underivatisiertem Rinder-Serumalbumin sowie dem Fusionsprotein kodiert von pBBP27 erhalten wurden (offene Kreise). Die dem jeweiligen gebundenen Fusionsprotein entsprechende enzymatische Aktivität wurde anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nicht lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) mittels der Gleichung

$$[P \bullet L] = [L]_t [P]_t / (K_d + [P]_t).$$

Hierbei entspricht $[P]_t$ der eingesetzten Gesamtkonzentration des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \bullet L]$ wird anhand der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die innerhalb einer Konzentrationsreihe konstante Gesamtkonzentration der Digoxigeningruppen $[L]_t$ je Vertiefung sowie die Dissoziationskonstante K_d wurden durch nicht lineare Regression als Parameter angepaßt.

Figur 4 zeigt das Ergebnis eines Western Blot-Experiments aus Beispiel 4 zum qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen mittels der von pBBP27 (Spuren 1 und 2) sowie von pBBP29 (Spuren 3 und 4) kodierten Fusionsproteine des Muteins DigA16. Zum Vergleich ist ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel der

Biomoleküle ebenfalls dargestellt (Spuren 5 und 6). Hierbei wurde in den Spuren 1, 3 und 5 jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg underivatisiertem BSA, underivatisiertem Ovalbumin und underivatisierter RNaseA aufgetrennt. In den Spuren 2, 4 und 6 5 wurde jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg mit Digoxigeningruppen gekoppeltem BSA, mit Digoxigeningruppen gekoppeltem Ovalbumin und mit Digoxigeningruppen gekoppelter RNaseA aufgetrennt.

Beispiele

10

Sofern nicht anders angegeben, wurden die dem Fachmann geläufigen gentechnischen Methoden, wie sie z.B. in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) beschrieben sind, verwendet.

15

Beispiel 1: Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins, Phagemidpräsentation und Selektion eines Muteins mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin

20

Zur Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurden dessen Aminosäure-Sequenzpositionen 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer konzertierten Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in mehreren Schritten unterworfen. Die 25 PCR-Reaktionen wurden zunächst in zwei getrennten Amplifizierungsschritten in einem Volumen von je 50 µl durchgeführt, wobei 10 ng pBBP20-Phasmid-DNA (SEQ ID NO:1) als Matrize sowie jeweils 25 pmol zweier Primer (SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 in einem Ansatz und SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 in 30 einem zweiten Ansatz), welche nach der allgemein bekannten Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, eingesetzt wurden.

Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10xTaq-Puffer (100 35 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % v/v Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂ und 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren

Thermostatisierblock für 2 min auf 94°C erhitzt. Anschließend wurden 2,5 u *Taq* DNA-Polymerase (5 u/μl, Promega) zugegeben und 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 60°C, 1,5 min bei 72°C, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei 60°C, 5 durchgeführt. Die gewünschten Amplifizierungsprodukte wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung des Jetsorb DNA Extraction Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers aus Low Melting Point Agarose (Gibco BRL) isoliert.

10 Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP20 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit einer Hexanukleotidsequenz, die durch Ligierung eines *Xba*I-Überhangs mit einem dazu komplementären Spei- 15 Überhang erhalten wurde, und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

20 Der darauffolgende Amplifizierungsschritt wurde in einem 100 μl-Ansatz durchgeführt, wobei jeweils ca. 6 ng der beiden isolierten Fragmente als Matrize, je 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 sowie 1 pmol des 25 Oligodesoxynukleotids SEQ ID NO:8 eingesetzt wurden. Die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden wie in den vorangegangenen Amplifizierungsschritten mit der doppelten Menge zugesetzt. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1,5 min bei 72°C statt, gefolgt von 30 einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 60°C. Das erhaltene Fragment wurde erneut durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Zur Klonierung dieses Fragments, welches die Bibliothek der 35 Muteine in Form einer Mischung von Nukleinsäuren repräsentierte, wurde es zunächst mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des erhaltenen Nukleinsäurefragments

(335 Basenpaare, bp) erfolgte wiederum mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese. Analog wurde die DNA des Vektors pBBP20 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3971 bp) isoliert.

5

Zur Ligierung wurden 0,93 μ g (4,2 pmol) des PCR-Fragments und 11 μ g (4,2 pmol) des Vektorfragments in Gegenwart von 102 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 500 μ l (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml BSA) für zwei Tage bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 μ l des Ligierungsansatzes mit 10 μ g tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 μ l 5 M Ammoniumacetat und 100 μ l Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20°C für drei Tage wurde 15 zentrifugiert (25 min, 16000 g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 200 μ l Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 43,6 μ l TE/10 (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch analytische 20 Agarose-Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden im Vergleich mit einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Präparation elektrokompetenter Zellen des *E. coli* K12-Stamms XL1-Blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-379) erfolgte gemäß den von Tung und Chow (Trends Genet. 11 (1995), 128-129) und von Hengen (Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 75-76) beschriebenen Methoden. 1 l LB-Medium wurde durch Zugabe einer stationären XL1-Blue Übernachtkultur auf 30 eine optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,08 eingestellt und bei 200 Upm und 26°C in einem 3 l-Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils 500 35 ml eiskaltem 10 % w/v Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem GYT-Medium (10 % w/v Glycerin, 0,125 % w/v Hefeextrakt, 0,25 % w/v Trypton) resuspendiert.

Zur Elektroporation wurde das Easyjec T Basic System (EquiBio) mit den dazugehörigen Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Jeweils 5 bis 6 μ l der oben beschriebenen DNA-Lösung (245 ng/ μ l) wurde mit 40 μ l der Zellsuspension gemischt, 5 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Küvette überführt. Nach der Elektroporation wurde die Suspension sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium (2 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) verdünnt 10 und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend jeweils für 2 min bei 3600 g sedimentiert, 15 in 1 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (LB/Amp) resuspendiert und zu je 200 μ l auf Agar-Platten (140 mm Durchmesser) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Unter Einsatz von insgesamt 10,7 μ g der ligierten DNA wurden auf diese Weise mit 15 acht Elektroporationsansätzen $3,73 \cdot 10^8$ Transformanden erhalten, die auf 40 Agar-Platten verteilt waren.

Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die so erhaltenen 20 Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm geschüttelt. 50 ml auf 37°C vorgewärmtes 25 2xYT/Amp-Medium wurden mit 2,88 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 1,0 lag. Diese Kultur wurde für 6 h bei 37°C, 160 Upm bis zu einer stationären Zelldichte inkubiert und die Phasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde schließlich in 100 μ l TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM 30 EDTA) aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von rekombinanten Phagemiden 35 (Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press), welche die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusion mit dem verkürzten Hüllprotein pIII tragen, wurde die so gewonnene Phasmid-DNA zur Transformation elektrokompetenter Zellen von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Elektroporation wurde wie oben beschrieben mit

Hilfe des Easyjec T Basic Systems durchgeführt. In insgesamt 13
Ansätzen wurden je 40 μ l der Zellsuspension elektrokompetenter
Zellen mit jeweils 2 μ g der DNA in einem Volumen von 5 μ l
transformiert. Nach der Elektroporation wurde die erhaltene
5 Zellsuspension aus jedem Ansatz sofort in 2 ml frischem,
eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200
Upm geschüttelt.

Diese Ansätze wurden vereinigt (Volumen = 26 ml), mit 74 ml
10 2xYT-Medium und mit 100 μ l Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml,
Endkonzentration 100 mg/l) versetzt. Durch Ausplattieren von
100 μ l einer 1:10⁵-Verdünnung der erhaltenen Suspension auf
Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der
erhaltenen Transformanden zu 1,1•10¹⁰ abgeschätzt. Nach
15 Inkubation für 60 min bei 37°C und 160 Upm wurde die Kultur mit
500 μ l VCS-M13 Helferphage (1,1•10¹² pfu/ml, Stratagene)
infiziert und für weitere 60 min bei 37°C, 160 Upm geschüttelt.
Anschließend wurden 200 μ l Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml,
Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur
20 auf 26°C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der
Genexpression Anhydrotetracyclin (50 μ l einer 50 μ g/ml-
Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 μ g/l)
zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur
schließlich für 7 h bei 26°C, 160 Upm inkubiert.

25 Zwecks Abtrennung der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (15
min, 12000 g, 4°C). Der Überstand, der die Phagemidpartikel
enthielt, wurde sterilfiltriert (0,45 μ m), mit 1/4 Volumen (25
ml) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl versetzt und über Nacht
30 bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18000 g, 4°C)
wurden die präzipitierten Phagemidpartikel in insgesamt 4 ml
kaltem PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4)
gelöst. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und zu
gleichen Volumina auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt.
35 Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile (5 min, 18500 g,
4°C) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß
überführt.

Zur erneuten Fällung der Phagemidpartikel wurde mit 1/4 Volumen (jeweils 0,25 ml pro Reaktionsgefäß) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18500 g, 4°C) wurde der Überstand entfernt, und die präzipitierten Phagemidpartikel wurden in jeweils 0,5 ml PBS gelöst. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Lösung zur Klärung noch einmal zentrifugiert (5 min, 18500 g, 4°C). Der Überstand mit den Phagemidpartikeln (zwischen $1 \cdot 10^{12}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) wurde anschließend für die Affinitätsanreicherung eingesetzt.

Zur Affinitätsanreicherung der die Muteine des Bilin-Bindungsproteins präsentierenden rekombinanten Phagemide wurden Immuno-Sticks (NUNC) verwendet. Diese wurden über Nacht mit 800 μ l eines Konjugats (100 μ g/ml) aus Ribonuclease A (RNaseA) und Digoxigenin in PBS beschichtet.

Zur Herstellung des Konjugats wurden 1,46 μ mol (0,96 mg) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS, Boehringer Mannheim) in 25 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung zu 0,73 μ mol (10 mg) RNaseA (Fluka) in 1 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz von dem RNaseA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBST (PBS mit 0,1 % v/v Tween 20) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBST wurde der Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 μ l der Phagemidlösung und 500 μ l Blockierungspuffer (2 % w/v BSA in PBST) für 1 h bei RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde die Lösung abgezogen und der Immuno-Stick achtmal mit jeweils 950 μ l PBST

für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich im Verlauf einer 15minütigen Inkubation des Immuno-Sticks mit 950 μ l einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS (0,742 mg Digoxigenin (Fluka) wurden hierzu in 19,2 μ l DMF gelöst und zu 5 930,8 μ l PBS gegeben) kompetitiv eluiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurden die 950 μ l Lösung der erhaltenen Elutionsfraktion (je nach Selektionszyklus zwischen 10⁶ und 10⁸ Colony-forming Units) kurz auf 37°C erwärmt, mit 4 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue (OD₅₅₀ = 0,5) gemischt und für 30 min bei 37°C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4°C), in 800 μ l frischen 2xYT-Mediums resuspendiert und auf vier Agar-Platten 15 mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm 20 geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37°C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inkuliert, so daß 25 die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37°C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert, mit 250 μ l VCS-M13 Helferphage (1,1•10¹² pfu/ml, Stratagene) infiziert, und es wurde weiter verfahren wie bereits oben beschrieben.

30 Mit den aus der ersten Affinitätsanreicherung erhaltenen Phagemiden wurden nacheinander acht weitere Anreicherungszyklen mit Immuno-Sticks, welche frisch mit dem Digoxigenin-RNaseA-Konjugat beschichtet waren, durchgeführt. Die nach dem letzten 35 Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Mischung der erhaltenen Kolonien wurde, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert. Mit

dieser Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

Um die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusionsprotein mit dem Strep-tag II sowie der Albumin-Bindungsdomäne produzieren zu können, wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor pBBP20 in den Vektor pBBP22 subkloniert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP22 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:9 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.

Dazu wurde die aus der Mischung der *E. coli*-Kolonien isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie oben beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Mit 5 μ l dieses Ligierungsansatzes wurden 200 μ l kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F^r nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert (Sambrook et al., supra), wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.

Die Transformanden wurden anschließend mittels eines Colony Screening Assays auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigeningruppe durchgemustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-

Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 µm) aufgelegt. Auf dieser Membran wurden 150 µl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 7,5 h bei 37°C 5 im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurecht-10 geschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 µm) nach den Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA, Sigma) in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für 15 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der 20 zusätzlich 200 µg/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die 25 Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22°C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Muteine als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

30 Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4°C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBST gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml 35 einer Lösung von 10 µg/ml eines Konjugates von BSA mit Digoxigenin in PBST inkubiert.

Zur Herstellung des Konjugates von BSA (Sigma) und Digoxigenin

wurde eine Lösung von 3,0 μ mol (1,98 mg) DIG-NHS in 25 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA (Sigma) in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert 5 und überschüssiges Reagenz von dem BSA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Um gebundenes Digoxigenin-BSA-Konjugat nachzuweisen, wurde die 10 Membran nach zweimaligem Waschen in 20 ml PBST für 1 h mit 10 ml Anti-Digoxigenin Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim, 1:1000 verdünnt in PBST) inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml PBST und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und für 10 min in AP- 15 Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μ l 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, Roth, 50 μ g/ml in Dimethylformamid) und 5 μ l Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, 75 μ g/ml in 70 % v/v 20 Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Muteine des Bilin- 25 Bindungsproteins, in Form der Fusionsproteine mit dem Strep-tag und der ABD, für Digoxigenin nachgewiesen.

Vier der Kolonien von der oberen Membran, welche zu einem aufgeprägten Farbsignal Anlaß gaben, wurden zur Herstellung von Kulturen in LB/Amp-Medium mit einem Volumen von 4 ml verwendet. 30 Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert, und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde einer Séquenzanalyse unterzogen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des T7 Sequencing Kits (Pharmacia) nach Herstellerangaben 35 unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11. Dabei wurde gefunden, daß alle vier untersuchten Plasmide die gleiche Nukleotidsequenz trugen. Das entsprechende Genprodukt wurde als Diga bezeichnet (SEQ ID NO:12). Die

Nukleotidsequenz von DigA wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt und ist im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

5 Beispiel 2: Partielle Zufallsmutagenese des Muteins DigA und Selektion von Muteinen mit verbesserter Bindungsaffinität zu Digoxigenin

10 Zur Verbesserung der Affinität zwischen dem Mutein DigA und Digoxigenin, welche gemäß Beispiel 3 zu 295 ± 36 nM bestimmt wurde, wurden die 6 Aminosäurepositionen 28, 31 und 34-37 in DigA für eine weitergehende partielle Zufallsmutagenese ausgewählt.

15 Zur Mutagenese dieser Positionen wurde die PCR mit einem degenerierten Oligodesoxynukleotid-Primer durchgeführt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μ l, wobei 2 ng der für DigA (SEQ ID NO:12) kodierenden Plasmid-DNA des Vektors pBBP22 als Matrize eingesetzt wurden. Der 20 Reaktionsansatz enthielt 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:13 und SEQ ID NO:7 sowie die restlichen Komponenten gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 65°C, 1,5 min bei 72°C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für 25 5 min bei 60°C. Das erhaltene DNA-Fragment wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anschließend mit *Bst*XI nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des resultierenden DNA-Fragmentes von 335 bp Länge erfolgte wiederum durch präparative Agarose-Gelelektrophorese.

30 Entsprechend wurde die DNA des Vektors pBBP24 mit *Bst*XI geschnitten und das erhaltene Fragment von 4028 bp isoliert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP24 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im 35 Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:14 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75. pBBP24 ist weitestgehend

identisch mit pBBP20 wobei das BBP-Gen mittels entsprechend eingeführter Stopp-Kodons inaktiviert ist.

Zur Ligierung wurden 1,3 µg des geschnittenen DNA-Fragmentes aus der PCR und 16,0 µg des Fragmentes von pBBP24 in Gegenwart von 120 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 600 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für 18 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20°C für zwei Wochen wurde zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 150 µl Ethanol (70 % v/v, -20°C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 80 µl TE/10 aufgenommen.

Die Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit der ligierten DNA durch Elektroporation wurde gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, wobei in 16 Ansätzen jeweils 40 µl Zellsuspension elektrokompetenter Zellen mit 5 µl der DNA-Lösung gemischt wurden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt.

Die vereinigten Suspensionen wurden mit 168 ml 2xYT-Medium und mit 200 µl Ampicillin versetzt (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l). Durch Ausplattieren von 100 µl einer 1:10⁴-Verdünnung der erhaltenen Zellsuspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanden zu 1,48•10⁹ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37°C und 160 Upm wurden die Transformanden mit 4 ml VCS-M13 Helperphage (6,3•10¹¹ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 30 min bei 37°C und 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 400 µl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur auf 26°C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der

Genexpression Anhydrotetracyclin (100 μ l einer 50 μ g/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 μ g/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26°C und 160 Upm inkubiert. Die 5 Abtrennung der Zellen und die Reinigung der Phagemide durch Fällung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Zur Affinitätsanreicherung aus der Bibliothek der Phagemide, welche das partiell mutierte Mutein DigA präsentierte, wurden 10 mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) zusammen mit einem Doppelkonjugat von BSA mit Digoxigenin und Biotin eingesetzt.

Zur Herstellung eines Doppelkonjugates von BSA mit Digoxigenin 15 und Biotin wurden 1,5 μ mol (0,99 mg) DIG-NHS in 12,5 μ l DMSO und 1,5 μ mol (0,68 mg) D-Biotinoyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester (Boehringer Mannheim) in 12,5 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der 20 Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrations-säule nach den Angaben des Herstellers von dem Doppelkonjugat abgetrennt.

25 Zur Anreicherung Digoxigenin bindender Phagemide wurden 40 μ l einer 0,5 μ M Lösung des Doppelkonjugats (33,5 μ g/ml) in PBS mit 260 μ l einer Lösung der frisch präparierten Phagemide (zwischen 5•10¹¹ und 5•10¹² cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, so daß Komplexbildung zwischen der Digoxigeningruppe und den 30 von den Phagemiden präsentierten Muteinen eintreten konnte. Anschließend wurde 100 μ l einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben.

Parallel wurden 100 μ l der kommerziell erhältlichen Suspension 35 der paramagnetischen Partikel dreimal mit jeweils 100 μ l PBS gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml Eppendorfgefäßes für 1 min in Suspension gehalten, anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des

Eppendorfgefäßes gesammelt und der Überstand abgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 μ l 2 % w/v BSA in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die 5 paramagnetischen Partikel mit der Mischung aus dem Doppelkonjugat und den Phagemiden versetzt, resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin- Bindungsstellen des Streptavidins wurde die Mischung schließlich mit 10 μ l einer Lösung von 4 μ M D-Desthiobiotin 10 (Sigma) in PBS versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurde auch verhindert, dass das Strep-tag II als Teil des Fusionsproteins aus den Muteinen und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit dem Streptavidin einen Komplex 15 bilden konnte.

15 Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml frischem PBST unter Zusatz von 1 mM D-Desthiobiotin gewaschen, die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten gesammelt und der Überstand wurde abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide 20 erfolgte durch 15minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 μ l 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde im Anschluß daran sofort durch Zugabe von 140 μ l 0,5 M Tris neutralisiert. 25

Zur Vermehrung der Phagemide wurde die erhaltene Elutionsfraktion entsprechend der Vorgehensweise in Beispiel 1 mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1- 30 Blue ($OD_{550} = 0,5$) gemischt und für 30 min bei 37°C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4°C), in 800 μ l frischem 2xYT-Medium resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach 35 Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm

geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-
5 Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inkkuliert, so daß die Zelldichte OD_{550} bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37°C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ inkubiert und mit 300 μ l VCS-M13 Helferphage ($6,3 \cdot 10^{11}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert. Anschließend erfolgte eine erneute Affinitäts-
10 selektion mit den paramagnetischen Partikeln und dem Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat unter den oben angegebenen Bedingungen. Auf diese Weise wurden insgesamt 4 Selektionszyklen durchgeführt.

15 Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Mit der Mischung der erhaltenen Kolonien, die, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert worden waren, wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

20 Anschließend wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen wie in Beispiel 1 aus dem Vektor pBBP24 in den Vektor pBBP22 subkloniert und kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert. Die Transformanden wurden schließlich wiederum gemäß Beispiel 1 auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die 25 Digoxigeningruppe mittels des Colony Screening Assays durchgemustert.

30 Sieben der Kolonien, die im Colony Screening Assay eine starke Signalintensität aufwiesen, wurden kultiviert. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde wie in Beispiel 1 einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde gefunden, daß alle

untersuchten Plasmide unterschiedliche Sequenzen besaßen. Nach Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wiesen sechs der sieben untersuchten Varianten ein Amber Stoppkodon an der Aminosäureposition 28 auf. Dieses Stoppkodon wurde allerdings bei der Wahl geeigneter Amber-Suppressorstämme, wie zum Beispiel *E. coli* XL1-Blue oder TG1-F', zumindest teilweise supprimiert und statt dessen als Glutamin translatiert. Somit wurde sowohl im Verlauf der Affinitätsanreicherung als auch beim Colony Screening Assay funktionelles Protein in voller Länge produziert.

Als einziges unter den gefundenen Muteinen wies das Mutein mit der SEQ ID NO:15 kein Amber-Stoppkodon auf, so daß es sich zur bakteriellen Produktion besonders gut eignete. Dieses Mutein, 15 auch als DigA16 bezeichnet, wurde demzufolge hinsichtlich seiner Bindefähigkeit für die Digoxigeningruppe genauer charakterisiert.

20 Beispiel 3: Produktion der Muteine DigA und DigA16 und Ermittlung ihrer Affinität für Digoxigenin und dessen Derivate durch Fluoreszenztitration

Zur präparativen Produktion der aus den vorangegangenen Beispielen erhaltenen Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurde der kodierende Genabschnitt zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor des Typs pBBP22 in das Expressionsplasmid pBBP21 subkloniert. Das dabei erhaltene Plasmid kodierte für ein Fusionsprotein aus der OmpA- 30 Signalsequenz, gefolgt von dem Mutein und dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP21 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im 35 Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:16 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit einem Hexanukleotid, das durch Ligierung eines stumpfen Strangendes mit einem aufgefüllten *Hind*III-Strangende erhalten wurde, wobei

die ursprüngliche *Hind*III-Schnittstelle verloren ging. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.

5 Zur Subklonierung wurde die für das jeweilige Mutein kodierende Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP21
10 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (4132 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM
15 $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und für 16 h bei 16°C inkubiert. Mit 5 μ l des Ligierungsansatzes wurde dann *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119) nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert, wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten
20 wurden. Von dieser Suspension wurden 100 μ l auf einer Agar-Platte mit LB/Amp-Medium ausplattiert und für 14 h bei 37°C inkubiert.

Zur Proteinproduktion wurde eine der erhaltenen Einzelkolonien
25 ausgewählt, eine 50 ml-Vorkultur (LB/Amp-Medium) damit angeimpft und bei 30°C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 40 ml der Vorkultur wurden auf 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft, woraufhin die Kultur bei 22°C und 30 200 Upm inkubiert wurde. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 μ g/l Anhydrotetracyclin (200 μ l einer 2 mg/ml-StammLösung in DMF) induziert und für weitere 3 h bei 22°C, 200 Upm geschüttelt.

35 Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 4420 g, 4°C) und nach Entfernung des Überstands unter Kühlung auf Eis in 20 ml Periplasma-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinander-

folgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (15 min, 4420 g, 4°C und 15 min, 30000 g, 4°C). Der so gewonnene periplasmatische Proteinextrakt wurde gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert, 5 sterilfiltriert und zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

Die Reinigung erfolgte mittels des an den C-Terminus der Muteine fusionierten Strep-tag II-Affinitätsanhängsels (Schmidt und Skerra, Protein Eng. 6 (1993), 109-122). Im vorliegenden 10 Fall wurde das Streptavidinmutein "1" eingesetzt (Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), welches (mit 5 mg/ml immobilisiertem Streptavidin, bezogen auf das Bettvolumen der Matrix) an eine aktivierte Sepharose gekoppelt war.

15 Eine mit 2 ml dieses Materials befüllte Chromatographiesäule wurde bei 4°C und einer Flußrate von 20 ml/h mit 10 ml SA-Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm des Eluats in einem Durchfluß- 20 Photometer verfolgt. Nach dem Auftragen des periplasmatischen Proteinextrakts wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit SA-Puffer gewaschen. Gebundenes Mutein wurde anschließend mit 10 ml einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin (Sigma) in SA-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die das gereinigte Mutein enthielten, 25 wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fling und Gregerson, Anal. Biochem. 155 (1986), 83-88) überprüft und vereinigt. Die Proteinausbeuten lagen zwischen 200 µg und 800 µg je 2 l Kultur.

30 Die Liganden-Bindungseigenschaften der Muteine DigA, DigA16 sowie des rekombinanten Bilin-Bindungsproteins (SEQ ID NO:16) wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt. 35 Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tyrosin- und/oder Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 345 nm (Spaltbreite 6 nm). Als

Liganden wurden Digoxigenin (Fluka), Digoxin (Fluka),
Digitoxigenin (Fluka), Digitoxin (Fluka), Testosteron (Sigma),
Ouabain (Fluka) sowie 4-Aminofluorescein (Fluka) eingesetzt.

Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine
5 signifikante Eigenfluoreszenz oder Absorption.

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA. Die
Lösung des jeweiligen gereinigten Muteins wurde viermal gegen
diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen auf eine
10 Konzentration von 1 μ M eingestellt. Alle verwendeten Lösungen
wurden sterilfiltriert (Filtropur S 0,45 μ m, Sarstedt). Die
Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Absorption bei
280 nm unter Verwendung kalkulatorischer Extinktions-
koeffizienten von 53580 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für DigA und DigA16 (Wisconsin
15 Software Package, Genetics Computer Group). Für Bbp wurde der
nach Gill und von Hippel (Anal. Biochem. 182 (1989), 319-326)
in Gegenwart von Guanidiniumchlorid korrigierte kalkulatorische
Extinktionskoeffizient von 54150 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

20 Zur Messung wurden 2 ml der Muteinlösung in einer Quarzküvette,
die mit einem Rührfisch ausgestattet war, vorgelegt und im
Probenhalter des Photometers auf 25°C temperiert. Anschließend
wurden insgesamt 40 μ l einer 100 μ M bis 500 μ M Lösung des
Liganden in demselben Puffer in Schritten von 1 μ l bis 4 μ l
25 zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der
vorgelegten Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei
der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach
jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung für
1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal als
30 Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes
für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100
% normiert.

35 Die so erhaltenen Meßwerte einer Titrationsreihe wurden gemäß
folgender Formel durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des
Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt.

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_d) \frac{f_p}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_p - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

5 Dabei bedeuten F die normierte Fluoreszenzintensität und $[L]_t$ die Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen
 10 Titrationsschritt. $[P]_t$ als die Konzentration des Muteins, f_{PL} als Fluoreszenzkoeffizient des Mutein-Ligandkomplexes und K_d als die thermodynamische Dissoziationskonstante dieses
 Komplexes wurden als freie Parameter an die normierten Daten angepaßt.

Das Ergebnis der Fluoreszenztitrationen des Muteins DigA16 mit den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain ist in
 15 Figur 1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß Digitoxigenin noch stärker gebunden wird als Digoxigenin, während für Ouabain keine Bindung beobachtet wird.

Die aus den Fluoreszenztitrationen resultierenden Werte für die
 20 Dissoziationskonstanten der Komplexe aus den Muteinen des Bilin-Bindungsproteins und den verschiedenen Liganden sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	<u>Bbp-Variante</u>	<u>Ligand</u>	<u>K_d [nM]</u>
25	Bbp:	Digoxigenin	-*
	DigA:	Digoxigenin	295 ± 37
		Digoxin	200 ± 34
	DigA16:	Digoxigenin	$30,2 \pm 3,6$
		Digoxin	$31,1 \pm 3,2$
30		Digitoxigenin	$2,8 \pm 2,7$
		Digitoxin	$2,7 \pm 2,0$
		Ouabain	-*
		Testosteron	-*
		4-Aminofluorescein	-*

Beispiel 4: Herstellung von Fusionsproteinen aus dem Mutein
DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase und
Verwendung zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem ELISA
sowie im Western Blot

5 Um zwei verschiedene Fusionsproteine aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) mit unterschiedlicher Anordnung der Partner innerhalb der Polypeptidkette zu produzieren, wurden unter Einsatz der dem 10 Fachmann geläufigen molekularbiologischen Methoden die beiden Expressionsplasmide pBBP27 und pBBP29 konstruiert.

15 pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus PhoA einschließlich deren Signalsequenz, einem kurzen Peptid-Verbindungsstück mit der Aminosäuresequenz Pro-Pro-Ser-Ala, der dem maturen Mutein DigA16 entsprechenden Sequenz sowie dem Strep-tag II. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP27 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:17 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der 20 XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

25 pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus DigA16 mit vorangestellter OmpA-Signalsequenz, gefolgt von der Peptidsequenz für das Strep-tag II, einer Sequenz von 5 Glycinresten und der maturen Sequenz der PhoA ohne die N-terminale Aminosäure Arginin. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP29 ist mit der kodierten 30 Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:18 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

35 Beide Plasmide kodieren zusätzlich für die bakterielle Protein-Disulfidisomerase DsbC auf einem separaten, in 3'-Richtung gelegenen Cistron. Die Plasmide sind in Figur 2 schematisch

dargestellt.

Die von den Plasmiden pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine wurden analog der in Beispiel 3 beschriebenen 5 Methode zur Herstellung der einfachen Muteine produziert. Um nicht die Metallionen aus dem aktiven Zentrum der PhoA zu komplexieren, wurde der Aufschluß des bakteriellen Periplasmas mit EDTA-freiem Aufschlußpuffer durchgeführt. Als ein die äußere Zellmembran destabilisierendes Agens wurde dem Puffer 10 Polymyxin-B-sulfat (2 mg/ml, Sigma) zugegeben. Alle weiteren zur Reinigung eingesetzten Puffer waren ebenfalls EDTA-frei.

Die mittels des Strep-tag II durch Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteine wurden über Nacht gegen PBS-Puffer 15 dialysiert. Die Ausbeuten der Fusionsproteine lagen zwischen 100 und 200 µg je 2 l Kulturmedium. Die Reinheit der erhaltenen Fusionsproteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgelektrophorese, entsprechend Beispiel 3, überprüft und zu 90-95 % bestimmt. Anschließend wurden die Fusionsproteine zum direkten Nachweis 20 von Konjugaten der Digoxigeningruppe mit verschiedenen Proteinen sowohl in einem Sandwich-ELISA als auch im Western-Blot verwendet.

Während die verwendeten Konjugate von Digoxigenin mit RNaseA 25 und BSA entsprechend Beispiel 1 hergestellt wurden, wurde ein Konjugat von Digoxigenin mit Ovalbumin (Sigma) hergestellt, indem 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (13,5 mg) Ovalbumin in 1,9 ml 5 % Natriumhydrogencarbonat gegeben wurden. Der Ansatz 30 wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Ovalbumin-Konjugat abgetrennt.

Zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem Sandwich-ELISA 35 wurden die Vertiefungen von jeweils zwei Spalten einer Mikrotiterplatte (ELISA-Strips, 2x8 Well mit hoher Bindekapazität, F-Form, Greiner) mit je 100 µl einer 100 µg/ml-Lösung des BSA-Digoxigenin-Konjugates bzw. des Ovalbumin-

Digoxigenin-Konjugates in PBS gefüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden die Vertiefungen einer fünften Spalte der Mikrotiterplatte mit 100 μ l einer 100 μ g/ml Lösung von nicht konjugiertem BSA (Sigma) in PBS gefüllt und ebenfalls über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden unbesetzte Bindungsstellen mit 200 μ l einer Lösung von 2 % w/v BSA in PBST für 2 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 50 μ l einer 1 μ M Lösung des gereinigten Fusionsproteins gefüllt und die Tween-Konzentration durch Zugabe von 1 μ l einer Lösung von 5 % v/v Tween auf 0,1 % v/v eingestellt. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 μ l PBST vorgelegt. Anschließend wurde jeweils in die zweite Vertiefung 50 μ l des gereinigten Fusionsproteins pipettiert, gemischt und davon ausgehend in den weiteren Vertiefungen der Spalte schrittweise 1:2 Verdünnungen zubereitet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der an die Digoxigeningruppen gebundenen Fusionsproteine erfolgte schließlich mittels der durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,8) in die Vertiefungen gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) verfolgt.

Das Ergebnis dieser Messung ist in Figur 3 wiedergegeben. Dementsprechend wird die Digoxigeningruppe sowohl als Konjugat mit BSA wie auch als Konjugat mit Ovalbumin erkannt, was darauf schließen läßt, daß die Bindung durch das Mutein DigA16 kontextunabhängig erfolgt. Weiterhin sind beide Fusionsproteine sowohl hinsichtlich der Bindungsfunktion für die Digoxigeningruppe als auch enzymatisch aktiv, und sie geben trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus Anlaß zu nahezu identischen Signalen.

Zur Verwendung der von den Vektoren pBBP27 und pBBP29 kodierten

Fusionsproteine im Western-Blot wurden 5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an Digoxigenin-BSA-Konjugat, Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat und Digoxigenin-RNaseA-Konjugat gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, sowie 5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an nicht-derivatisiertem BSA, Ovalbumin und RNaseA ebenfalls gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Proteingemisch durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose übertragen (Blake et al., Anal. Biochem. 136 (1984), 175-179). Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min in 10 ml PBST gewaschen und für 1 h mit 10 ml einer 0,5 μ M Lösung jeweils eines der beiden Fusionsproteine inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 5 min in 10 ml PBST und zweimal für 5 min in 10 ml PBS gewaschen und schließlich für 10 min in 10 ml AP-Puffer geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μ l BCIP (50 μ g/ml in Dimethylformamid) und 5 μ l NBT (75 μ g/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert und auf diese Weise gebundenes Fusionsprotein nachgewiesen.

Das Ergebnis dieses Nachweisverfahrens ist in Figur 4 wiedergegeben. Es zeigt sich wiederum, daß die Bindung der Digoxigeningruppe durch beide Fusionsproteine unabhängig vom Trägerprotein ist, und daß mit beiden Fusionsproteinen vergleichbare Signalintensitäten erzielt werden. Dieselben Trägerproteine führen zu keinerlei Signal, wenn sie nicht mit der Digoxigeningruppe konjugiert sind.

Patentansprüche

1. Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - 5 (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
 - (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
 - (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 10 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.
- 15 2. Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationskonstante des Komplexes mit Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist.

3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine der 20 Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum 25 Bilin-Bindungsprotein trägt.

4. Polypeptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO. 15 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.

- 30 5. Polypeptid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Markierungsgruppe, ausgewählt aus Enzymmarkierung, radioaktiver Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-35 Lumineszenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold, trägt.

6. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder

5 mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

10 7. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den 15 Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

15 8. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin- Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 kodierende Sequenz umfaßt.

20 9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO. 15 oder eine andere das Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 15 codierende Nukleotidsequenz umfaßt.

25 10. Verfahren zur Gewinnung von Digoxigenin bindenden Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, das die Schritte umfaßt:

(a) das Bilin-Bindungsprotein an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer Zufallsmutagenese zu unterwerfen,

30 (b) resultierende Muteine mit Bindungsaffinität zur Digoxigeningruppe durch Selektion anzureichern und zu isolieren,

35 (c) die in Schritt (b) erhaltenen Muteine an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 einer erneuten Zufallsmutagenese zu unterwerfen, und

(d) die resultierenden Muteine wiederum durch Selektion anzureichern und zu isolieren.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei in Schritt (b) die Selektion durch kompetitive Anreicherung durchgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei freies
5 Digoxigenin oder Digitoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei die Anreicherung in Schritt (d) durch Komplexbildung der
10 Muteine mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des Komplexes durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Dissoziation des Komplexes aus Mutein und Digoxigeningruppe in saurem oder
15 basischem Milieu durchgeführt wird.

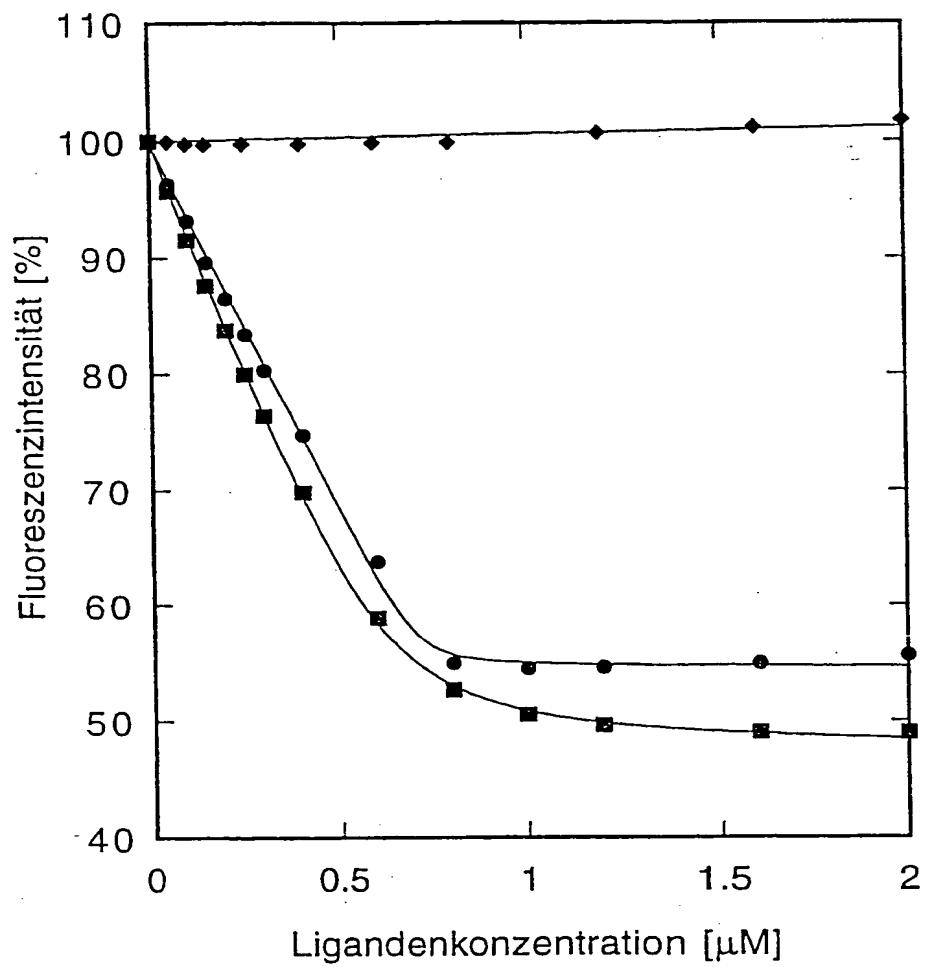
15. Verfahren zur Herstellung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder zur Herstellung eines Muteins, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 erhältlich ist, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird.

16. Verwendung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Muteins, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 erhältlich ist, zur Bindung, zum Nachweis, zur Bestimmung, Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

17. Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei

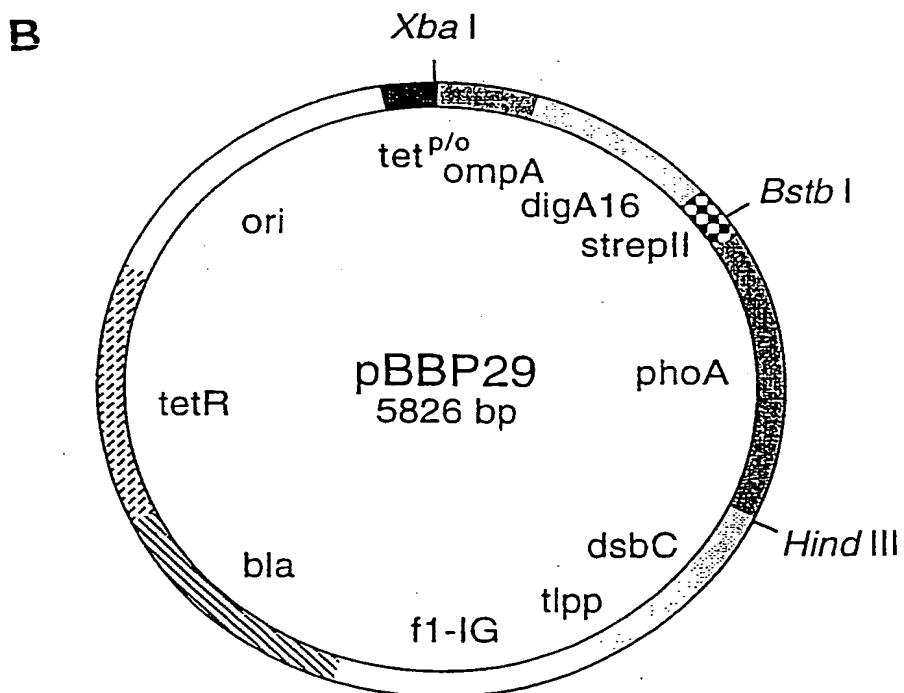
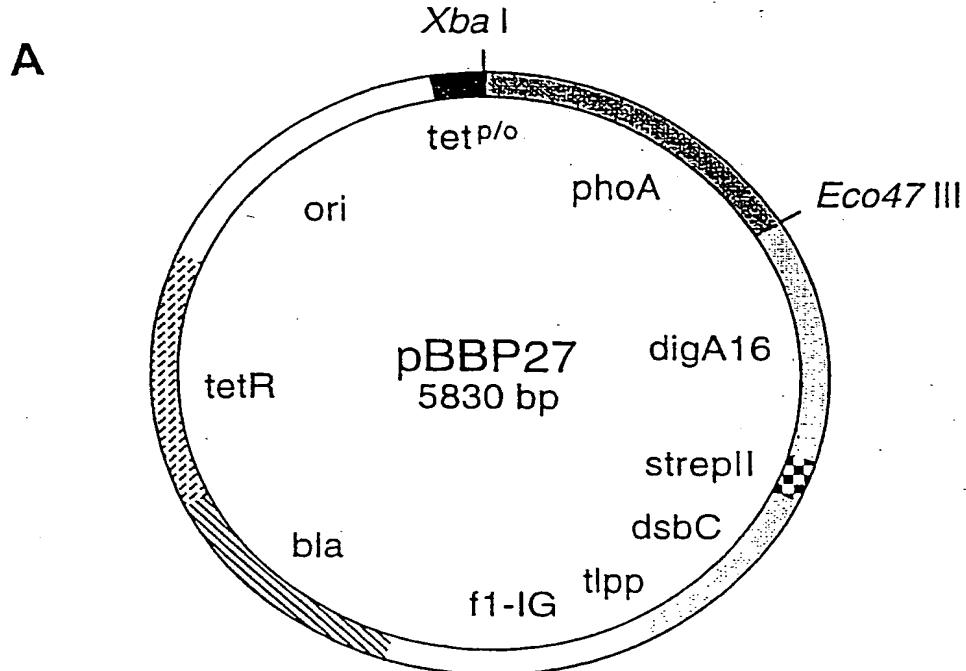
ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Mutein, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 5 erhältlich ist, mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

1 / 4



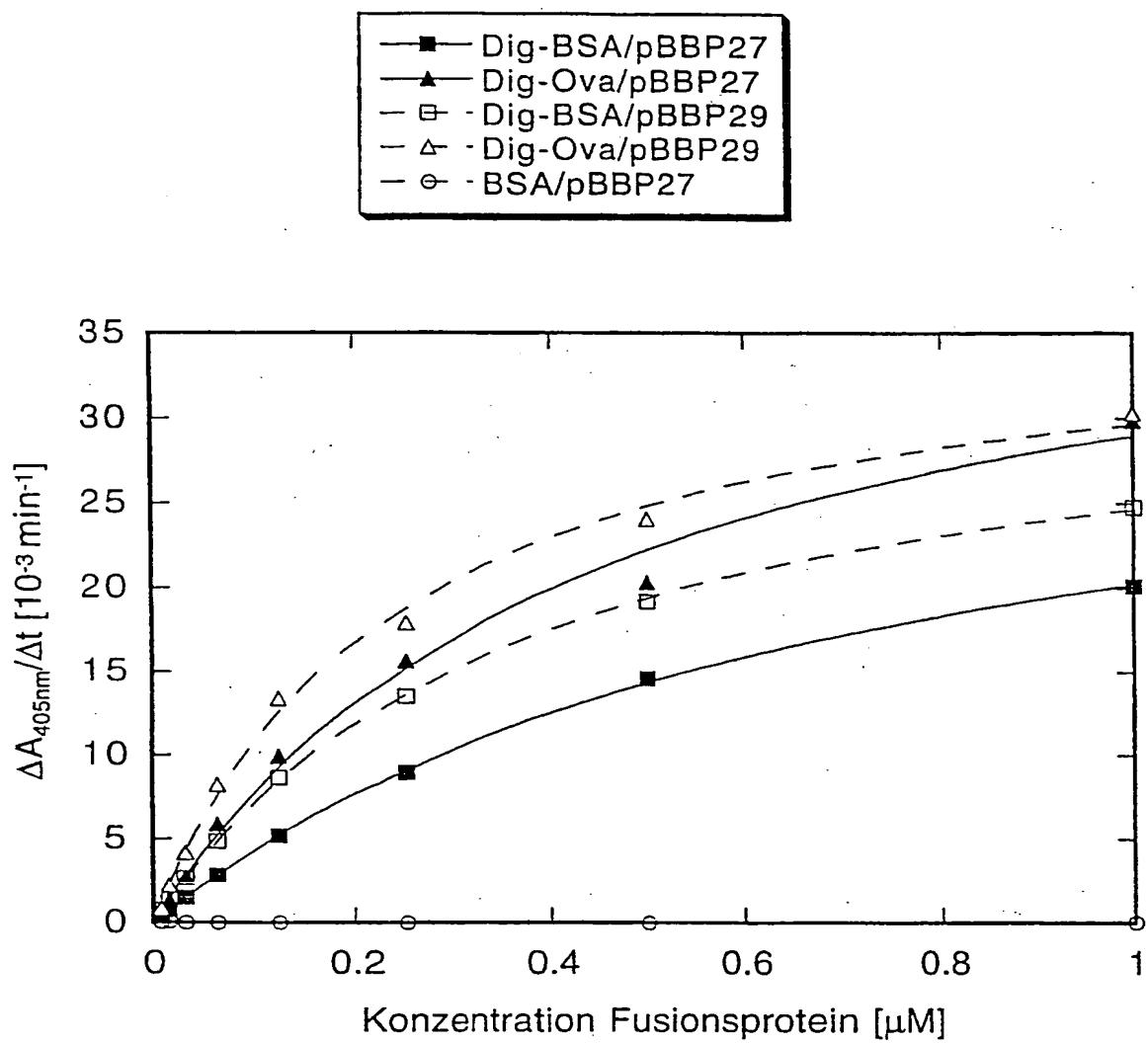
Figur 1

2/4



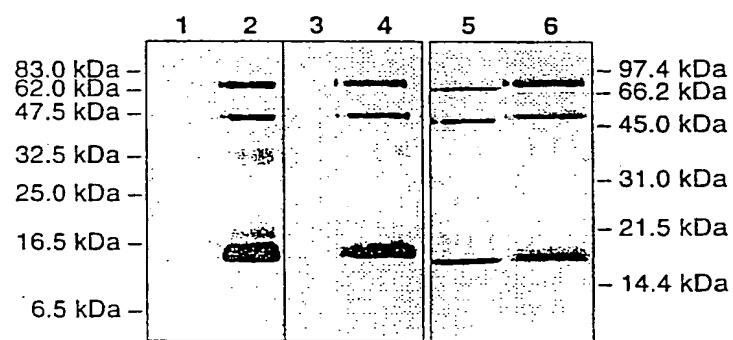
Figur 2

3 / 4



Figur 3

4 / 4



Figur 4

Sequenzprotokoll

<110> Skerra, Arne, Prof. Dr.

5 <120> Muteine des Bilin-Bindungsproteins

<150> DE 199 26 068.0

<151> 1999-06-08

10 <160> 18

<210> 1

<211> 1219 Basenpaare

<212> DNA

15 <213> künstliche Sequenz

<220>

<221> sig_peptide

<222> (22) ... (84)

20 <220>

<221> mat_peptide

<222> (85) ... (1209)

<223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-tag II und Fragment des

25 Phagen-Hüllproteins pIII

<220>

<221> CDS

<222> (85) ... (606)

30 <223> matures Bilin-Bindungsprotein

<220>

<221> CDS

<222> (607) ... (636)

35 <223> Strep-tag II-Affinitätsanhängsel

<220>

<221> CDS

<222> (637) ... (639)

40 <223> Amber Stop-Codon

<220>

<221> CDS

<222> (640) ... (1209)

45 <223> Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII

<400> 1

5	TCTAGTTAAC GAGGGCAAAA A	ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT	45
	Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile		
	-21 -20	-15	
10	GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTC GCG CAG GCC GAC GTG	90	
	Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val		
	-10 -5	-1 1	
15	TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC	135	
	Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe		
	5 10	15	
20	GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC	180	
	Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr		
	20 25	30	
25	CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC	225	
	Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr		
	35 40	45	
30	ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC	270	
	Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile		
	50 55	60	
35	CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT	315	
	His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly		
	65 70	75	
40	GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT	360	
	Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly		
	80 85	90	
45	GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG	405	
	Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys		
	95 100	105	
50	AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG	450	
	Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys		
	110 115	120	
55	GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT	495	
	Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu		
	125 130	135	
60	ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC	540	
	Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser		
	140 145	150	
65	CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA	585	
	Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu		
	155 160	165	
70	GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC	630	
	Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe		
	170 175	180	
75	GAA AAA TAG GCT GGC GGC GGC TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC	675	
	Glu Lys Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	185 190	195	
80	TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC	720	
	Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly		
	200 205	210	

TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765
 Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe
 215 220 225

5 GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810
 Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu
 230 235 240

10 AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855
 Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu
 245 250 255

15 GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900
 Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
 260 265 270

20 GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945
 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 275 280 285

25 TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990
 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp
 290 295 300

30 AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035
 Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu
 305 310 315

35 CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080
 Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys
 320 325 330

40 CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125
 Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg
 335 340 345

45 GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170
 Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val
 350 355 360

50 TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT 1209
 Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 365 370 375

55 TAATAAGCTT 1219

<210> 2
 <211> 64 Basen
 50 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Primer
 55 ...

<400> 2

60 CCATGGTAAA TGGTGGGAAG TCGCCAAATA CCCCNNKNMS NNSNNKAAGT 50
 ACGGAAAGTG CGGA 64

<210> 3

<211> 71 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Primer

<400> 3

10 GGGTAGGC GG TACCTCSNN AAAGTATTCC TTGCCGTGGA TTACMNNGTA 50
SNNCGAAACT TTGACACTCT 71

<210> 4

15 <211> 74 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>

20 <223> Primer

<400> 4

25 CCAAGATTGG AAAGATCTAC CACAGCNNSA CTNNKGGAGG TNNSACCVVS 50
GAGNNKGTAT TCAACGTACT CTCC 74

<210> 5

30 <211> 78 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>

35 <223> Primer
<400> 5

TCTGGAGAGC ACCCAGACMN NGTCSNNGTG TCCCTTCTTG TCCTCGTCGT 50
ASNNNGCAMNN GTATCCGATG ATGTAGTT 78

40 <210> 6
<211> 36 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Primer

<400> 6

50 CTTCGACTGG TCCCAGTACC ATGGTAAATG GTGGGA 36

<210> 7
<211> 37 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

5

<220>
<223> Primer
<400> 7

10 CACCAAGTAAG GACCATGCTT CTGGAGAGCA CCCAGAC 37

<210> 8
<211> 46 Basen
15 <212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> synthetischer Oligodesoxynukleotid
20 <400> 8

AGATCTTC AATCTTGGAG TCACCAACTG GGTAGGCGGT ACCTTC 46

25

<210> 9
<211> 793 Basenpaare
<212> DNA
<213> Fragment des Plasmids pBBP22

30

<220>
<221> sig_peptide
<222> (22) ... (84)

35

<220>
<221> mat_peptide
<222> (85) ... (783)
<223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-Tag II und Albumin-bindungsdomäne

40

<220>
<221> CDS
<222> (85) ... (606)
<223> matures Bilin-Bindungsprotein

45

<220>

<221> CDS

<222> (607) ... (636)

<223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

5 <220>

<221> CDS

<222> (637) ... (783)

<223> Albumin-Bindungsdomäne aus Protein G

10 <400> 9

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 -21 -20 -15

15 GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
 -10 -5 -1 1

20 TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
 Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
 5 10 15

25 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
 Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
 20 25 30

30 CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
 Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
 35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTC ATC 270
 Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
 50 55 60

35 CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
 65 70 75

40 GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
 80 85 90

45 GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
 Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
 95 100 105

50 AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
 110 115 120

55 GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
 Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
 125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
 140 145 150

60 CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
170 175 180

5 GAA AAA CCA GCT AGC CTG GCT GAA GCT AAA GTT CTG GCT AAC CGT 675
Glu Lys Pro Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
185 190 195

10 GAA CTG GAC AAA TAC GGT GTT TCC GAC TAC TAC AAA AAC CTC ATC 720
Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
200 205 210

15 AAC AAC GCT AAA ACC GTT GAA GGT GTT AAA GCT CTG ATC GAC GAA 765
Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu
215 220 225

20 ATT CTC GCA GCA CTG CCG TAATAAGCTT 793
Ile Leu Ala Ala Leu Pro
230

25 <210> 10
<211> 17 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Sequenzierprimer

35 GACGGTGCCT GTCCCGA 17
<210> 11
<211> 17 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Sequenzierprimer
<400> 11

45 GACTACTGGG GAGCCGA 17
<210> 12
<211> 522 Basen
<212> DNA
<213> codierende Sequenz des Muteins DigA

50 <220>
<221> CDS
<222> (1)...(522)
<223> Mutein DigA ohne Fusionsanteile

55

<400> 12

5	GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp 1 5 10 15	45
10	AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala 20 25 30	90
15	AAA TAC CCC CAT CAC GAG CGG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT Lys Tyr Pro His His Glu Arg Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala 35 40 45	135
20	GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser 50 55 60	180
25	GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro 65 70 75	225
30	GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile 80 85 90	270
35	GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp 95 100 105	315
40	AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp 110 115 120	360
45	AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met 125 130 135	405
50	GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile 140 145 150	450
55	GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe 155 160 165	495
60	TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn 170	522
	<210> 13	
	<211> 76 Basen	
	<212> DNA	
	<213> künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Primer	
	<400> 13	
	CTGGTCCCAG TACCATGGTA AATGGTGGNN KGTCGCCNNK TACCCNNKN NKNNKNNKAA GTACGGAAAG TGCGGA	50 76

<210> 14
<211> 1219 Basenpaare
<212> DNA
<213> Fragment des Phasmids pBBP24

5 <220>
<221> sig_peptide
<222> (22) ... (84)

10 <220>
<221> mat_peptide
<222> (85) ... (1209)
<223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-Tag II und Fragment des Phagen-Hüllproteins pIII, mit unterbrochenem Leserahmen

15 <220>
<221> CDS
<222> (85) ... (606)
<223> matures Bilin-Bindungsprotein mit unterbrochenem Leserahmen

20 <220>
<221> CDS
<222> (607) ... (636)
<223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

25 <220>
<221> CDS
<222> (637) ... (639)
<223> Amber-Stoppcodon

30 <220>
<221> CDS
<222> (640) ... (1209)
<223> Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII

35 <400> 14

TCTAGATAAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
40 -21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
-10 -5 -1 1

45 TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
5 10 15

50 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr

	20	25	30
5	CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAT TAA TGA TGG GCT GAG TAC 225 Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Asn Trp Ala Glu Tyr 35 40 45		
10	ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270 Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile 50 55 60		
15	CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly 65 70 75		
20	GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly 80 85 90		
25	GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405 Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys 95 100 105		
30	AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys 110 115 120		
35	GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495 Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu 125 130 135		
40	ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser 140 145 150		
45	CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu 155 160 165		
50	GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe 170 175 180		
55	GAA AAA TAG GCT GGC GGC GGC TCT GGT GGT TCT GGC GGC GGC 675 Glu Lys Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly 185 190 195		
60	TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC 720 Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly 200 205 210		
65	TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765 Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe 215 220 225		
70	GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810 Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu 230 235 240		
75	AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855 Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu 245 250 255		
80	GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900 Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile 260 265 270		
85	GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp		

	275	280	285	
5	TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp 290 295 300			
10	AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035 Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu 305 310 315			
15	CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080 Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys 320 325 330			
20	CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125 Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg 335 340 345			
25	GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170 Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val 350 355 360			
	TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT 1209 Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser 365 370 375			
	TAATAAGCTT			1219

30 <210> 15
 <211> 522 Basenpaare
 <212> DNA
 <213> codierende Sequenz des Muteins DigA16

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(522)
 <223> Mutein DigA16 ohne Fusionsanteile

40 <400> 15

45	GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp 1 5 10 15	45
50	AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG GTC GCC Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln Val Ala 20 25 30	90
55	GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT 135 Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala 35 40 45	
60	GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT 180 Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser 50 55 60	
	GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA 225 Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro 65 70 75	

GTT CGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
 Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile
 80 85 90

5 GGA CGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
 Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp
 95 100 105

10 AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
 Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp
 110 115 120

15 AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG 405
 Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met
 125 130 135

GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC 450
 Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile
 140 145 150

20 GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
 Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe
 155 160 165

25 TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT 522
 Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn
 170

30 <210> 16
 <211> 1380 Basenpaare
 <212> DNA
 <213> Fragment des Plasmids PBBP21

35 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (22) ... (84)

40 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (85) ... (636)
 <223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein und Strep-Tag II

45 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (658) ... (717)

50 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (718) ... (1365)
 <223> DsbC-Protein

<400> 16

55 TCTAGATAAC GACGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile

-21 -20

-15

5 GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
 -10 -5 -1 1

10 TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
 Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
 5 10 15

15 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
 Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
 20 25 30

20 CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
 Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
 35 40 45

25 ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
 Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
 50 55 60

30 CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
 65 70 75

35 GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
 80 85 90

40 GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
 Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
 95 100 105

45 AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
 110 115 120

50 GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
 Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
 125 130 135

55 ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
 140 145 150

60 CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

65 GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180

70 GAA AAA TAATAAGCTT CGGGAAAGATT T ATG AAG AAA GGT TTT ATG 675
 Glu Lys Met Lys Gly Phe Met
 -20 -15

75 TTG TTT ACT TTG TTA GCG GCG TTT TCA GGC TTT GCT CAG GCT GAT 720
 Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly Phe Ala Gln Ala Asp
 -10 -5 -1 1

80 GAC GCG GCA ATT CAA CAA ACG TTA GCC AAA ATG GGC ATC AAA AGC 765
 Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met Gly Ile Lys Ser
 5 10 15

85 AGC GAT ATT CAG CCC GCG CCT GTA GCT GGC ATG AAG ACA GTT CTG 810
 Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys Thr Val Leu

	20	25	30
5	ACT AAC AGC GGC GTG TTG TAC ATC ACC GAT GAT GGT AAA CAT ATC 855 Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys His Ile 35 40 45		
10	ATT CAG GGG CCA ATG TAT GAC GTT AGT GGC ACG GCT CCG GTC AAT 900 Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val Asn 50 55 60		
15	GTC ACC AAT AAG ATG CTG TTA AAG CAG TTG AAT GCG CTT GAA AAA 945 Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys 65 70 75		
20	GAG ATG ATC GTT TAT AAA GCG CCG CAG GAA AAA CAC GTC ATC ACC 990 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr 80 85 90		
25	GTG TTT ACT GAT ATT ACC TGT GGT TAC TGC CAC AAA CTG CAT GAG 1035 Val Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu 95 100 105		
30	CAA ATG GCA GAC TAC AAC GCG CTG GGG ATC ACC GTG CGT TAT CTT 1080 Gln Met Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu 110 115 120		
35	GCT TTC CCG CGC CAG GGG CTG GAC AGC GAT GCA GAG AAA GAA ATG 1125 Ala Phe Pro Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met 125 130 135		
40	AAA GCT ATC TGG TGT GCG AAA GAT AAA AAC AAA GCG TTT GAT GAT 1170 Lys Ala Ile Trp Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp 140 145 150		
45	GTG ATG GCA GGT AAA AGC GTC GCA CCA GCC AGT TGC GAC GTG GAT 1215 Val Met Ala Gly Lys Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp 155 160 165		
50	ATT GCC GAC CAT TAC GCA CTT GGC GTC CAG CTT GGC GTT AGC GGT 1260 Ile Ala Asp His Tyr Ala Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly 170 175 180		
55	ACT CCG GCA GTT GTG CTG AGC AAT GGC ACA CTT GTT CCG GGT TAC 1305 Thr Pro Ala Val Val Leu Ser Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr 185 190 195		
60	CAG CCG CCG AAA GAG ATG AAA GAA TTC CTC GAC GAA CAC CAA AAA 1350 Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu Phe Leu Asp Glu His Gln Lys 200 205 210		
	ATG ACC AGC GGT AAA TAATT CGCGT AGCTT Met Thr Ser Gly Lys 215		1380

<210> 17
 <211> 2009 Basenpaare
 <212> DNA
 <213> Fragment des Plasmids PBBP27

 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (23) . . . (85)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (86) ... (1999)
 <223> Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase, Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala, Mutein DigA16 und Strep-Tag II

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (86) ... (1435)
 <223> maturer Teil der Alkalischen Phosphatase

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1436) ... (1447)
 15 <223> Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1448) ... (1969)
 20 <223> Mutein DigA16

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1970) ... (1999)
 25 <223> Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel

<400> 17

30 TCTAGAACAT GGAGAAAATA AA GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG 46
 Val Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu
 -21 -20 -15

35 GCA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA 91
 Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr
 -10 -5 -1 1

40 CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT 136
 Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile
 5 10 15

45 ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC 181
 Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala
 20 25 30

50 GCT CTG CGT GAT TCT CTT AGC GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT 226
 Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile
 35 40 45

55 TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA 271
 Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala
 50 55 60

CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT 316
 Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp
 65 70 75

GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA 361
 Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys
 80 85 90

5 AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA 406
 Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala
 95 100 105

10 ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC 451
 Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly
 110 115 120

15 GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA 496
 Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala
 125 130 135

20 AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG 541
 Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu
 140 145 150

25 CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC 586
 Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg
 155 160 165

30 30 AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC 631
 Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn
 170 175 180

35 GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT 676
 Ala Leu Glu Lys Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu
 185 190 195

40 AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG CTT GGC GGC GCA AAA ACC TTT 721
 Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Ala Lys Thr Phe
 200 205 210

45 GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT 766
 Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg
 215 220 225

50 GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC 811
 Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala
 230 235 240

55 TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT 856
 Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu
 245 250 255

60 GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG 901
 Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro
 260 265 270

65 AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT 946
 Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys
 275 280 285

70 ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG 991
 Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln
 290 295 300

75 ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC 1036
 Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly
 305 310 315

80 TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT 1081
 Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His
 320 325 330

GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT 1126
 Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp
 335 340 345
 5 GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC 1171
 Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn
 350 355 360
 10 ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT 1216
 Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile
 365 370 375
 15 GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT 1261
 Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn
 380 385 390
 20 ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA 1306
 Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu
 395 400 405
 25 GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG 1351
 Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala
 410 415 420
 30 TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC 1396
 Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr
 425 430 435
 35 GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG CTG AAA CCG CCT 1441
 Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys Pro Pro
 440 445 450
 40 AGC GCT GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA 1486
 Ser Ala Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro
 455 460 465
 45 GTC GAC AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG 1531
 Val Asp Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln
 470 475 480
 50 GTC GCC GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA 1576
 Val Ala Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly
 485 490 495
 55 TGG GCT GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC 1621
 Trp Ala Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg
 500 505 510
 60 TAC TCT GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC 1666
 Tyr Ser Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala
 515 520 525
 65 TAC CCA GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC 1711
 Tyr Pro Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr
 530 535 540
 70 ACT ATT GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTC CTC TCC 1756
 Thr Ile Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser
 545 550 555
 75 ACT GAC AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC 1801
 Thr Asp Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Gys Ser Tyr Asp
 560 565 570
 80 GAG GAC AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA 1846
 Glu Asp Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg
 575 580 585

AGC ATG GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC 1891
Ser Met Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr
590 595 600

5 CTT ATC GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT 1936
Leu Ile Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser
605 610 615

10 GAC TTC TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT 1981
Asp Phe Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser
620 625 630

15 CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAATAAGCTT 2009
His Pro Gln Phe Glu Lys
635

<210> 18

20 <211> 2005 Basenpaare

<212> DNA

<213> Fragment des Plasmids PBBP29

<220>

25 <221> sig_peptid

<222> (22) ... (84)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (85) ... (1998)

30 <223> Fusionsprotein aus Mutein DigA16, Strep-Tag II, Verbindungspeptid
Gly(5) und Alkalischer Phosphatase

<220>

<221> CDS

35 <222> (85) ... (606)

<223> Mutein DigA16

<220>

<221> CDS

40 <222> (607) ... (636)

<223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

<220>

<221> CDS

45 <222> (637) ... (651)

<223> Verbindungspeptid Gly-Gly-Gly-Gly-Gly

<220>

<221> CDS

50 <222> (652) ... (1998)

<223> Alkalische Phosphatase ohne Signalsequenz und N-terminales Arg

<400> 18

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 5 -21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
 10 -10 -5 -1 1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
 Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
 5 10 15

15 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG GTC GCC GCG TAC 180
 Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln Val Ala Ala Tyr
 20 25 30

20 CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
 Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
 35 40 45

25 ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT GTA ATC 270
 Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser Val Ile
 50 55 60

CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA GTT GGT 315
 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
 65 70 75

30 GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT GGA GGT 360
 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile Gly Gly
 80 85 90

35 GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
 Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
 95 100 105

40 AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
 110 115 120

45 GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
 Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
 125 130 135

50 ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
 140 145 150

55 CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

60 GAA AAA GGT GGC GGC GGT GGT ACA CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA 675
 Glu Lys Gly Gly Gly Gly Thr Pro Glu Met Pro Val Leu Glu
 185 190 195

65 AAC CGG GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC 720
 Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg
 200 205 210

CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC GCT CTG CGT GAT TCT CTT AGC 765
 Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser

	215	220	225	
5	GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG 810 Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met 230 235 240			
10	GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG 855 Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala 245 250 255			
15	GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA 900 Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln 260 265 270			
20	TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC 945 Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr 275 280 285			
25	GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC 990 Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val 290 295 300			
30	AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT 1035 Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp 305 310 315			
35	CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC 1080 His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr 320 325 330			
40	GGT AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG 1125 Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala 335 340 345			
45	CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG 1170 Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala 350 355 360			
50	ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA 1215 Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys 365 370 375			
55	GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG 1260 Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr 380 385 390			
60	CTT GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT 1305 Leu Gly Gly Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly 395 400 405			
65	GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT 1350 Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly 410 415 420			
	TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA 1395 Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu 425 430 435			
	GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT 1440 Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn 440 445 450			
	ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT 1485 Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn 455 460 465			
	ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT 1530 Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn			

	470	475	480	
	GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA 1575			
5	Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu			
	485	490	495	
	TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT 1620			
	Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly			
10	500	505	510	
	GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA 1665			
	Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln			
	515	520	525	
15	ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG 1710			
	Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu			
	530	535	540	
20	GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT 1755			
	Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala			
	545	550	555	
25	GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT 1800			
	Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala			
	560	565	570	
	CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG 1845			
	Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met			
30	575	580	585	
	GTC ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC 1890			
	Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr			
	590	595	600	
35	GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT 1935			
	Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn			
	605	610	615	
40	GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA 1980			
	Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys			
	620	625	630	
45	GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAAGCTT		2005	
	Ala Ala Leu Gly Leu Lys			
	635			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/DE 00/01873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 March 1999 (1999-03-02), pages 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph ---</p> <p>WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8 April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims ---</p>	
A		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 2000

Date of mailing of the international search report

30/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/01873

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 318, 1996, pages 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6, left column; Fig. 4e); Table 2; ---	
A	SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 219, no. 3, 1994, pages 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 cited in the application figure 1 ---	
A	WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27 July 1989 (1989-07-27) example 21 ---	
A	EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15 April 1998 (1998-04-15) the whole document ---	
P, X	SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 297, no. 5, 14 April 2000 (2000-04-14), pages 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 the whole document ---	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01873

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9916873	A 08-04-1999	DE 19742706 A		15-04-1999
		AU 1143799 A		23-04-1999
		EP 1017814 A		12-07-2000
WO 8906698	A 27-07-1989	DE 3813278 A		20-07-1989
		AT 87665 T		15-04-1993
		DE 58903898 D		06-05-1993
		EP 0324474 A		19-07-1989
		ES 2054883 T		16-08-1994
		HK 116996 A		12-07-1996
		JP 7031194 B		10-04-1995
		JP 1503647 T		07-12-1989
		US 5702888 A		30-12-1997
		US 5344757 A		06-09-1994
EP 0835934	A 15-04-1998	DE 19641876 A		16-04-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01873

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
IPK 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 5, 2. März 1999 (1999-03-02), Seiten 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph ---</p>	
A	<p>WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8. April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims --- -/-</p>	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. Oktober 2000

30/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen
PCT/DE 00/01873

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 318, 1996, Seiten 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6 , left column; Fig. 4e); Table 2;	
A	SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 219, Nr. 3, 1994, Seiten 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1	
A	WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27. Juli 1989 (1989-07-27) Beispiel 21	
A	EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15. April 1998 (1998-04-15) das ganze Dokument	
P, X	SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 297, Nr. 5, 14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01873

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9916873 A	08-04-1999	DE	19742706 A	15-04-1999
		AU	1143799 A	23-04-1999
		EP	1017814 A	12-07-2000
WO 8906698 A	27-07-1989	DE	3813278 A	20-07-1989
		AT	87665 T	15-04-1993
		DE	58903898 D	06-05-1993
		EP	0324474 A	19-07-1989
		ES	2054883 T	16-08-1994
		HK	116996 A	12-07-1996
		JP	7031194 B	10-04-1995
		JP	1503647 T	07-12-1989
		US	5702888 A	30-12-1997
		US	5344757 A	06-09-1994
EP 0835934 A	15-04-1998	DE	19641876 A	16-04-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.